



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

(11) BR 122017017790-7 B1

(22) Data do Depósito: 29/03/2004

(45) Data de Concessão: 12/06/2018



(54) Título: SISTEMA E MÉTODOS PARA SEPARAR PARTÍCULAS E PARA PROVER A IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMO X E/OU Y

(51) Int.Cl.: G01N 15/00

(30) Prioridade Unionista: 28/03/2003 US 60/458,607, 28/03/2003 US 60/458,731

(73) Titular(es): INGURAN LLC

(72) Inventor(es): GARY DURACK; JEREMY T. HATCHER; LON A. WESTFALL; DAVID R. HELBLING; JEFFREY D. WALLACE; GARY P. VANDRE; BRADLEY DIDION; NIRAJ V. NAYAK; MUHAMMAD ANZAR; CINDY L. LUDWIG; JEFFREY A. GRAHAM; KATHLEEN S. CROWLEY

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"SISTEMA E MÉTODOS PARA SEPARAR PARTÍCULAS E PARA PROVER A IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMO X E/OU Y"**.

[001] Dividido do PI0408857-3, depositado em 29.03.2004.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Esta invenção refere-se, de maneira geral, a um aparelho e métodos para a coleta de sêmen de animais, e, mais particularmente, a um aparelho e métodos que usam várias técnicas, incluindo a citometria de fluxo, para produzir populações de esperma que são enriquecidas com células de esperma apresentando uma ou mais características, tais como populações viáveis de células de esperma separadas de acordo com as características de DNA para uso na indústria de produção animal para pré-selecionar o sexo da linhagem animal.

[003] A fertilização de animais através de inseminação artificial (AI) e transplante de embrião depois da fertilização in vitro é uma prática estabelecida. Na indústria de produção de gado, a capacidade para influenciar o resultado reprodutivo na direção da linhagem apresentando uma ou mais características desejadas apresenta vantagens óbvias. Por meio de exemplo, seria um benefício econômico na indústria de laticínio o de pré-selecionar a linhagem em favor do sexo feminino para assegurar a produção de vacas leiteiras. Tem havido um grande empenho para se atingir este objetivo com o uso da citometria de fluxo para separar células de esperma X e Y, conforme evidenciado pelas descrições nas Patentes U.S. N^{os} 6.357.307 (Buchanan e outros), 5.985.216 (Rens e outros), e 5.135.759 (Johnson). Entretanto, nenhum destes esforços resultou na introdução de um sistema de alto rendimento comercialmente bem-sucedido capaz de produzir volumes de produção de células de esperma de sexo relativamente puras apresentando uma mobilidade suficiente para a fertilização eficaz.

[004] Conseqüentemente, há uma necessidade atual na indústria

de produção animal de um sistema viável de alta velocidade para eficientemente isolar células de esperma com base em uma característica de DNA específica (ou outras características) para produzir quantidades de tais células que possa ser usado em uma escala comercial. Também há necessidade de um sistema de manipulação de esperma que preserve a viabilidade de tal esperma isolado à medida que ele é processado pelo sistema de isolamento e que permita a preservação de tal esperma isolado até o momento em que esteja pronto para uso. A presente invenção endereça estas necessidades.

[005] Esta invenção também tem aplicação em aperfeiçoamentos no campo da citometria de fluxo em uma base mais geral. A citometria de fluxo pode ser amplamente definida como características de medição de partículas individuais à medida que elas passam geralmente em uma única fila em um fluxo de fluido através de um dispositivo de medição que tipicamente forneça informação para classificar as partículas de acordo com as características selecionadas. Opcionalmente, as partículas podem ser então separadas em populações com o uso de qualquer número de técnicas, incluindo a separação de gotícula, a separação por interferência de gotícula, e a ligação de fluido. Outra opção é a de seletivamente destruir as partículas indesejadas, por exemplo, pela fotoablação.

[006] Em um sistema de citometria de fluxo com base óptica, a óptica é usada para direcionar e focalizar um feixe de luz (por exemplo, luz visível ou luz UV) no fluxo contendo as partículas, e para coletar emissões originárias das partículas, incluindo a luz dispersa e/ou emissões de fluorescência originárias das partículas. Em um sistema de óptica comum, por exemplo, um feixe de luz (por exemplo, um feixe de laser) é focalizado no fluxo e emissões são coletadas por um par de unidades de coleta, uma posicionada adiante do laser para coletar as emissões de luz dispersa e a outra posicionada ortogonalmente tanto

ao fluxo como ao laser para coletar emissões de fluorescência. Cada unidade de coleta inclui um fotodetector separado, o que aumenta o custo do sistema. Adicionalmente, nos sistemas ópticos tradicionais, os fotodetectores traduzem as emissões coletadas em sinais elétricos, que são analisados com o uso de sistemas analógicos para classificar as partículas de acordo com as características selecionadas das partículas. Os sistemas analógicos são relativamente econômicos, mas apenas informação limitada pode ser derivada dos sinais.

[007] Outros tentaram desenvolver a tecnologia que pode ser usada para processar células de esperma para se obter populações de células de esperma que são enriquecidas com esperma que apresentam um cromossomo de sexo desejado. Entretanto, a tecnologia existente carece das tecnologias da invenção descritas aqui.

[008] Por exemplo, Johnson e outros (Patente U.S. Nº 5.135.759), descrevem a separação de populações intactas de esperma conduzindo cromossomos X e Y de acordo com o teor de DNA com o uso de um citômetro de fluxo/separador de células em populações enriquecidas com esperma conduzindo cromossomos X e Y. Conforme descrito, o esperma é combinado com um corante seletivo de DNA em uma temperatura de 30 a 39°C por um período de 1 hora (39°C) a 1,5 hora (30°C). Um citômetro de fluxo é então usado para medir a quantidade de luz fluorescente emitida à medida que o esperma passa através de um feixe de laser que excita o corante. Devido ao fato do esperma conduzindo cromossomos X conter mais DNA que o esperma conduzindo cromossomos Y, com a maioria das espécies de mamíferos apresentando cerca de 3 a 5% de diferença, o esperma conduzindo cromossomos X emite mais luz fluorescente do que o esperma conduzindo cromossomos Y. A fim de levar em conta o fato de que a medição de fluorescência pode variar dependendo da orientação rotacional das células de esperma, são usados dois fotodetectores. O

primeiro determina se as células de esperma são adequadamente orientadas, ao passo que o segundo faz uma medição que é usada para classificar o esperma como apresentando um cromossomo X ou Y. Um oscilador é usado para fazer com que o fluxo contendo o esperma se rompa em gotículas a jusante do lugar onde o esperma atravessa o feixe de laser. Gotículas contendo esperma único de uma intensidade fluorescente predeterminada recebem uma carga e são eletrostaticamente defletidas em vasos de coleta. A população coletada de esperma enriquecido de gênero é então usada para microinjeção, fertilização in vitro, ou inseminação artificial.

[009] Seidel e outros (WO 02/43574) também descrevem a separação de esperma em populações enriquecidas de gênero de células conduzindo cromossomos X e Y com o uso de citometria de fluxo. Seidel e outros descrevem o tingimento das células em uma temperatura entre 30°C e 40°C.

[0010] A Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos Nº 2003/0157475 A1 (Schenk, 21 de agosto de 2003) descreve um processo de criopreservação de células de esperma que foram separadas de acordo com o teor de cromossomo X ou Y. Conforme notado aqui, é desejável acrescentar um crioprotetor às células de esperma antes que elas sejam criopreservadas para protegerem as células de esperma durante o processo de criopreservação. Por exemplo, glicerol é um crioprotetor que é comumente acrescentado às células de esperma bovino antes da criopreservação. Entretanto, a fim de se obter uma melhor proteção a partir do crioprotetor, é desejável esperar que o crioprotetor se equilibre com as células de esperma antes de submeter as células de esperma às temperaturas abaixo de 0°C. Durante o período de equilibração, o crioprotetor penetra na membrana da célula para prover a proteção intracelular além de qualquer proteção extracelular provida pelo crioprotetor. Desse modo, os processos de criopreser-

vação descritos na Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos Nº 2003/0157475 A1 especificam que um extensor contendo glicerol é acrescentado às células de esperma depois que elas foram resfriadas a cerca de 5°C. Então, as células de esperma e o glicerol podem ser equilibrados em 5°C em qualquer lugar entre 1 e 18 horas antes que as células de esperma sejam submetidas a temperaturas inferiores. A descrição recomenda um período de equilíbrio dentre três e seis horas a fim de se obter os melhores resultados.

[0011] Infelizmente, o tempo e as despesas envolvidas em um período de equilíbrio de 3 a 6 horas terão um impacto negativo sobre a rentabilidade de um processo comercial de separação de esperma. Adicionalmente, no contexto de um processo comercial de separação de esperma, acredita-se que a saúde do esperma seja geralmente aperfeiçoada pela redução do tempo entre a coleta do esperma e a criopreservação (outros fatores sendo iguais). A partir deste ponto de vista também, seria desejável se ter acesso à tecnologia de criopreservação que não exige um longo período de equilíbrio para se obter ótimos benefícios de um crioprotetor. Além disso, a tecnologia de criopreservação conhecida é relatada como tendo um impacto nocivo sobre a motilidade de esperma, o que é indicativo da menor fertilidade do esperma. Portanto, há necessidade de técnicas de criopreservação que preservem a saúde do esperma comparadas às técnicas convencionais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0012] Esta invenção refere-se a um sistema aperfeiçoado (métodos e aparelho) para analisar, classificar e separar partículas com base em uma ou mais características: a provisão de tal sistema, que, em uma concretização, usa a citometria de fluxo para isolar e separar com precisão células pelo teor de DNA; a provisão de tal sistema, que, em certas concretizações, incorpora protocolos de separação que permi-

tem a saída do sistema seja controlada como uma função de um ou mais fatores, incluindo a pureza da população separada desejada de partículas, a taxa na qual a população de partículas desejadas é coletada, a perda das partículas desejadas não-separadas na população desejada, e outros fatores; a provisão de tal sistema, que, em uma concretização, opera em alta velocidade para prover esperma separado por sexo para uso comercial pela indústria de produção animal; a provisão de tal sistema, que pode ser usado para separar células sem efeito prejudicial significativo sobre as células, incluindo a motilidade das células de esperma; a provisão de um sistema que pode ser usado para preservar células de esperma separadas até que elas sejam necessárias com um efeito prejudicial mínimo sobre as células, incluindo a motilidade das células; a provisão de tal sistema que, à medida que ele se refere à produção de esperma sexual, incorpora técnicas que aumentam a velocidade e a precisão da classificação e separação das células de esperma; a provisão de um sistema de citometria de fluxo que usa a óptica de epi-iluminação para detectar várias características de partículas a serem analisadas e, opcionalmente separadas; a provisão de tal sistema de citometria de fluxo de epi-iluminação que é econômico de ser fabricado; a provisão de um sistema, que, em uma concretização, incorpora múltiplas unidades de citometria de fluxo que compartilham de uma plataforma integrada para classificar e (opcionalmente) separar partículas, tais como células, em geral, e células de esperma, em particular, em altas taxas de produção; a provisão de tal sistema de múltiplos canais que compartilha de componentes comuns e sistemas para reduzir variações entre os canais para uma operação mais eficiente; e a provisão de tal sistema de separação que, em uma concretização, incorpora protocolos que permitem que uma amostra seja rapidamente testada para determinar a qualidade das amostras, de modo que a rentabilidade da separação adicional possa ser avalia-

da.

[0013] Além disso, esta invenção refere-se a um sistema aperfeiçoado (métodos e aparelho) para digitalmente processar sinais que representam a fluorescência; a provisão de tal sistema digital, em uma concretização, para detectar pulsos convertidos do analógico para o digital como uma função de características de segundo plano; a provisão de tal sistema digital, em uma concretização, para inicializar parâmetros de discriminação; a provisão de tal sistema digital, em uma concretização, para detectar informação digital correspondente aos pulsos de forma de onda; a provisão de tal sistema digital, em uma concretização, para classificar pulsos e definir limites de decisão; a provisão de tal sistema digital, em uma concretização, que emprega um sensor de ruptura de gotículas para controlar a amplitude de transdutor; e a provisão para usar tal sistema digital, em uma concretização, para distribuir e coletar células para distribuição comercial.

[0014] Adicionalmente, esta invenção refere-se a um sistema compreensivo aperfeiçoado (aparelho e métodos) para o processamento comercial de sêmen de animal a partir do momento em que uma amostra de sêmen é coletada de um animal macho através da criopreservação de uma amostra de esperma contendo uma porcentagem maior de um esperma apresentando uma característica de cromossomo desejada que existe no sêmen coletado; a provisão de tal sistema, em uma concretização, que permite o processamento eficiente de quantidades comerciais de esperma enriquecido de gênero viável; a provisão de tal sistema que permite, em uma concretização, o ajuste do sistema para neutralizar as variações de dia para dia e de animal para animal nas características do sêmen; a provisão de tal sistema que, em uma concretização, permite a produção de cerca de 18.000.000 espermatozoides enriquecidos de gênero por hora por intermédio de uma única unidade de citometria de fluxo em 85% de pureza; e a

provisão de tal sistema que permite, em uma concretização, o completo processamento de uma batelada de sêmen (por exemplo, a quantidade de sêmen coletado de um animal macho) para produzir amostras de esperma viáveis apresentando uma característica de gênero desejada em 85% de pureza com menos de 10% de perda do esperma coletado apresentando a característica de gênero desejada em cerca de 1 hora de tempo de processamento.

[0015] Em geral, esta invenção refere-se ao aparelho e métodos mencionados nas reivindicações deste pedido.

[0016] Outros objetivos e características desta invenção se tornam, em parte, evidentes e, em parte, mostrados adiante.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0017] A figura 1 é um diagrama de fluxo de trabalho para um processo exemplificativo de separação de espermatozoides da presente invenção.

[0018] A figura 2 é um diagrama esquemático de uma concretização de um sistema de separação de gotícula de citometria de fluxo da presente invenção.

[0019] A figura 3 é uma vista lateral de uma porção de uma concretização de um aparelho de citometria de fluxo da presente invenção para a separação de gotículas que mostra uma montagem óptica de epi-iluminação que focaliza um feixe de excitação em um fluxo de fluido móvel ascendente gerado por um sistema de bocal.

[0020] A figura 4 é uma vista de extremidade de uma concretização de um bocal e suporte de bocal da presente invenção.

[0021] A figura 5 é uma vista em seção do bocal e do suporte de bocal da figura 4, tomada através do plano de corte 5-5 na figura 4.

[0022] A figura 6 é um diagrama esquemático de uma célula de esperma aprisionada em um fluxo de fluido que é interrogada por um ponto de feixe elipticamente formado, de acordo com uma concretiza-

ção da presente invenção.

[0023] A figura 7 é um diagrama esquemático que mostra o invólucro angular para a orientação desejada de uma célula de esperma na qual o feixe de luz originário do sistema óptico irá atingir uma face larga da célula geralmente no sentido da largura.

[0024] A figura 8 é uma vista em seção de uma concretização de um corpo de bocal da presente invenção.

[0025] A figura 9 é uma vista lateral do corpo de bocal mostrado na figura 8, que mostra uma série de planos de corte (A-A através de H-H e J-J através de K-K) através do corpo de bocal.

[0026] As figuras 9A-9H e 9J-9K são vistas em seção do corpo de bocal mostrado nas figuras 8 e 9 ao longo dos planos correspondentes (A-A através de H-H e J-J através de K-K) da figura 9.

[0027] A figura 10 é uma vista em perspectiva de uma seção transversal de uma concretização de um sistema de bocal apresentando um defletor de orientação no bocal.

[0028] A figura 11 é uma vista em seção transversal do sistema de bocal mostrado na figura 10.

[0029] A figura 12 é uma vista em seção transversal parcial ampliada de uma porção do sistema de bocal mostrado nas figuras 10 e 11.

[0030] A figura 13 é uma vista em seção transversal parcial similar à vista mostrada na figura 12, mas tomada a partir de uma direção que é perpendicular à direção de visualização na figura 12.

[0031] A figura 14 é uma vista lateral de uma concretização do suporte de defletor que sustenta uma placa defletora.

[0032] A figura 15 é uma vista de topo do suporte de defletor e da placa defletora mostrados na figura 14.

[0033] A figura 16 é uma vista de topo de uma concretização de um suporte de defletor giratoriamente orientado em um bocal, de modo que as pernas da placa defletora se intersectem em uma linha que é

paralela ao eixo principal da elipse D no bocal.

[0034] A figura 17 é uma vista de topo de uma concretização de um suporte de defletor giratoriamente orientado em um bocal, de modo que as pernas da placa defletora se intersectem em uma linha que é perpendicular ao eixo principal da elipse D no bocal.

[0035] A figura 18 é uma vista em seção transversal lateral de uma concretização de um sistema de bocal que inclui um defletor, que mostra uma série de planos de corte (A-A através de E-E) através do bocal e do defletor.

[0036] A figura 19 é uma vista em seção transversal similar à figura 12, tomada através de um bocal que apresenta uma placa defletora que é perpendicular ao eixo longitudinal do bocal.

[0037] A figura 20 é uma vista em seção transversal do bocal mostrado na figura 19, tomada através do plano de corte 20-20 mostrado na figura 19.

[0038] A figura 21 é uma vista em seção transversal similar à vista em seção transversal da figura 18 que mostra um sistema de bocal apresentando um conduto de introdução de amostra em uma localização deslocada.

[0039] A figura 22 é uma vista em perspectiva de uma concretização de um sistema de bocal montado em um suporte de bocal da presente invenção.

[0040] A figura 23 é um diagrama esquemático de uma pluralidade de células de esperma alinhadas que são giratoriamente orientadas à medida que elas passam através de um membro de orifício da presente invenção na direção da localização de interrogação.

[0041] A figura 24 é um diagrama esquemático que mostra a localização de ruptura de gotícula a jusante a partir do bocal, de acordo com uma concretização da presente invenção.

[0042] A figura 25 é um diagrama esquemático de uma concretiza-

ção de um sistema de sensor de ruptura da presente invenção.

[0043] A figura 26 é uma elevação frontal de um sistema de citometria de fluxo da presente invenção.

[0044] A figura 27 é uma vista em perspectiva ampliada de uma porção do sistema mostrado na figura 26 com partes do sistema removido para fins de clareza.

[0045] A figura 28 é um diagrama esquemático de uma concretização de um sistema óptico de epi-iluminação da presente invenção.

[0046] A figura 29 é uma vista em perspectiva de uma concretização de um sistema óptico de epi-iluminação da presente invenção.

[0047] A figura 30 é uma vista lateral do sistema óptico de epi-iluminação mostrado na figura 29.

[0048] A figura 31 é uma vista de topo do sistema óptico de epi-iluminação mostrado nas figuras 29 e 30.

[0049] A figura 32 é uma vista em seção do sistema óptico de epi-iluminação ao longo do plano 32-32 da figura 30.

[0050] A figura 33 é uma vista em seção de uma porção do sistema óptico de epi-iluminação ao longo do plano 23-33 da figura 31.

[0051] A figura 34 é uma vista em perspectiva que mostra apenas os elementos do sistema de filtragem ótica que estão na parte detrás do filtro dicróico do sistema óptico de epi-iluminação mostrado na figura 29.

[0052] A figura 35 é uma vista em perspectiva de outro sistema óptico de epi-iluminação da presente invenção que inclui o ajuste de translação da lente cilíndrica.

[0053] A figura 36 é um diagrama esquemático de uma localização de interrogação de uma concretização da presente invenção que mostra um feixe de laser focalizado em um fluxo de fluido a jusante do bocal em um ângulo oblíquo de incidência.

[0054] A figura 37 é um diagrama esquemático de uma concretiza-

ção de um sistema de calibração de separação.

[0055] A figura 38 é um diagrama esquemático de uma concretização de um sensor de epi-iluminação para uso com a calibração de separação mostrada na figura 37.

[0056] A figura 39 é um diagrama de bloco de uma concretização de um analisador de célula digital (DCA) e controlador de processador, de acordo com a invenção.

[0057] A figura 40 é um diagrama esquemático de uma concretização de um separador de múltiplos canais da presente invenção que mostra dois canais.

[0058] A figura 41 é um diagrama de fluxo de trabalho de uma concretização de um separador de múltiplos canais da presente invenção que mostra quatro canais.

[0059] A figura 42 é um diagrama de bloco de uma concretização de um analisador de célula analógico (ACA), de acordo com a invenção.

[0060] A figura 43 é um gráfico que ilustra um fluxo de pulsos de forma de onda originários de uma saída de fotodetector que detecta pulsos fluorescentes de células que fluem em uma taxa média de 10.000 células/segundo.

[0061] A figura 44 é uma vista explodida da figura 43 que ilustra o fluxo proveniente de uma saída de fotodetector que detecta três pulsos fluorescentes originários de três células que fluem em uma taxa média de 10.000 células/segundo; uma onda quadrada de um relógio de gotículas de 100MHz foi sobreposta na ilustração para mostrar a sincronização entre os três pulsos e os pulsos de forma de onda do relógio de gotículas.

[0062] A figura 45 ilustra o movimento de uma célula de espermatozoides com relação a um ponto de feixe de laser apresentando uma largura estreita.

[0063] A figura 49 é uma ilustração exemplificativa da informação digital que corresponde a uma saída analógica de variação de tempo originária de um fotodetector que detecta um único pulso fluorescente com base em 122 amostras em uma taxa de amostragem contínua de 105MHz.

[0064] A figura 50 é um diagrama esquemático que ilustra a relação de sincronização entre os pulsos de laser, as emissões de fluorescência originárias de uma célula resultantes dos pulsos de laser e das amostras digitais da saída de fotodetector em uma concretização da invenção.

[0065] A figura 51 é um diagrama esquemático que ilustra como as amostras digitais mostradas na figura 50 formam uma forma de onda de pulso.

[0066] A figura 52 é um diagrama esquemático que ilustra como as amostras digitais mostradas na figura 50 formam uma forma de onda de pulso.

[0067] A figura 52 é um diagrama esquemático de uma forma de onda de pulso de uma célula de esperma X sincronizada com a forma de onda de pulso de uma célula de esperma Y que mostra a intensidade de pico mais alta na forma de onda de pulso para a célula de esperma X.

[0068] A figura 53 é um diagrama esquemático de uma forma de onda de pulso que mostra uma janela de limite e integração que pode ser usada para a análise de pulso.

[0069] A figura 54 é um histograma de uma amostra contendo células de esperma X e Y que mostram a alta resistência obtida com as técnicas de varredura dividida.

[0070] A figura 55 é um histograma de uma amostra contendo células de esperma X e Y que mostra a resolução relativamente pobre conseguida com iluminação padrão.

[0071] As figuras 56-59 mostram histogramas de fluorescência e gráficos de dispersão de pico versus a área dos núcleos de esperma e células de esperma vivas.

[0072] As figuras 60-61 ilustram um modelo de quatro componentes de um histograma de intensidade de fluorescência para as células de esperma - a figura 60 mostra dados brutos e a figura 61 mostra curvas de modelo geradas por uma concretização de um algoritmo iterativo da presente invenção com base nos dados mostrados na figura 60.

[0073] As figuras 62-63 ilustram um modelo de três componentes de um histograma de intensidade de fluorescência para as células de esperma - a figura 62 mostra os dados brutos e a figura 63 mostra as curvas de modelo geradas por uma concretização de um algoritmo iterativo da presente invenção com base nos dados mostrados na figura 62.

[0074] A figura 64 ilustra a natureza não-linear da característica CSD; o painel de topo mostra gráficos M médios para células de esperma conduzindo X e conduzindo Y ; o painel intermediário mostra um gráfico dos primeiros derivativos destes gráficos M médios (isto é, M') para valores de amplitude de sinal menores que a altura de pico do pulso médio de emissão de fluorescência conduzindo Y ; e o painel inferior mostra a diferença entre os primeiros derivativos ($M'_x - M'_y$) como uma função da amplitude de sinal.

[0075] A figura 65 ilustra uma concretização na qual a característica CSD é o grau de inclinação computado de uma linha que passa através de dois pontos no pulso de emissão de fluorescência.

[0076] As figuras 66-69 ilustram a discriminação aperfeiçoada alcançada pelo uso da extração de característica CSD.

[0077] A figura 70 ilustra uma região de separação bivariável em um gráfico de dispersão de CSD versus a dispersão de área de pulso.

[0078] A figura 71 ilustra uma concretização das reanálises de citometria de fluxo para um teste no qual o painel esquerdo corresponde à estratégia de separação de aceitação coincidente/alta recuperação (nenhuma estratégia de aborto de coincidência) e o painel direito corresponde à estratégia de separação de rejeição coincidente/alta pureza (estratégia de aborto coincidente).

[0079] A figura 72 é um diagrama de fluxo de trabalho de uma concretização de processamento de sinal digital da presente invenção.

[0080] A figura 73 é um exemplo de uma estratégia de agrupamento de Meio k que pode ser empregada de acordo com uma concretização da presente invenção.

[0081] A figura 74 é uma ilustração conceitual e representação gráfica de aplicação de uma regra de decisão de Erro Mínimo de Bayes aos dados de característica de pulso à medida que podem ser empregados de acordo com uma concretização da presente invenção.

[0082] A figura 75 é uma representação gráfica dos resultados obtidos com o uso de uma regra de decisão de Erro Mínimo de Bayes e do limiar de distância Mahalonobis, conforme pode ser empregada de acordo com uma concretização da presente invenção.

[0083] A figura 76 é uma ilustração conceitual de estatística de janela móvel para prover o "esquecimento" conforme pode ser empregada de acordo com uma concretização da presente invenção.

[0084] A figura 77 é uma compensação de desvio de representação gráfica conforme pode ser empregada de acordo com uma concretização da presente invenção.

[0085] A figura 78 ilustra um fluxo de fluido contendo uma distribuição exemplificativa de partículas.

[0086] A figura 79 é um gráfico que mostra a pureza como uma função da taxa de distribuição de fluido com uma estratégia de separação de aceitação coincidente.

[0087] A figura 80 é um gráfico que mostra a porcentagem de partículas desejadas separadas com sucesso na população usável como uma função da taxa de distribuição de fluido com uma estratégia de separação de rejeição coincidente.

[0088] A figura 81 é um gráfico que mostra a relação inversa entre a porcentagem de gotículas coincidentes aceitas para separação em uma população de partículas desejadas comparada à porcentagem de gotículas coincidentes rejeitadas para separação nessa população.

[0089] A figura 82 é um diagrama de fluxo de decisão que mostra toda a operação de uma concretização de um aparelho de separação da presente invenção.

[0090] A figura 83 é uma vista em elevação de um citômetro orientado para produzir um fluxo de gotículas apresentando um componente de velocidade horizontal e um sistema de coleta para coletar as gotículas.

[0091] A figura 84 é uma vista em perspectiva ampliada do sistema de coleta mostrado na figura 83, mostrada com relação ao sistema de bocal e placas defletoras.

[0092] A figura 85 é um diagrama esquemático de uma concretização de um sistema de coleta da presente invenção.

[0093] A figura 86 é uma elevação frontal de um dispositivo de interceptação do sistema de coleta mostrado na figura 83.

[0094] A figura 87 é uma vista lateral de um dispositivo de interceptação do sistema de coleta mostrado na figura 83.

[0095] As figuras 88-95 mostram resultados gráficos de diversos experimentos de centrifugação de esperma.

[0096] As figuras 96-98 são diagramas esquemáticos que ilustram as etapas em uma concretização de um processo de filtração da presente invenção.

[0097] A figura 99 é um diagrama esquemático de uma concretiza-

ção de um sistema de filtração usado para filtrar células de esperma.

[0098] A figura 100 é um diagrama esquemático de outro sistema de filtração usado para filtrar células de esperma.

[0099] As figuras 101 e 102 mostram resultados gráficos de experimentos de filtração de célula de esperma.

[00100] A figura 103 é um diagrama de fluxo de trabalho para uma concretização de um processo de criopreservação da presente invenção.

[00101] A figura 104 mostra resultados gráficos para um experimento de criopreservação de célula de esperma.

[00102] A figura 105 é um diagrama de fluxo de trabalho para uma concretização de um método de processar células de esperma de acordo com a presente invenção.

[00103] A figura 106 é uma vista em perspectiva de uma concretização de um separador de partículas de múltiplos canais da presente invenção com partes rompidas para mostrar características internas do separador.

[00104] A figura 107 é uma vista em perspectiva de um sistema de tubulação que pode ser usado para a distribuição de fluido no separador de partículas de múltiplos canais da figura 106.

[00105] A figura 108 é uma vista em perspectiva do sistema de tubulação da figura 107 que mostra as conexões de fluido internas do sistema de tubulação.

[00106] A figura 109 é uma vista em perspectiva do separador de partículas mostrado na figura 106 com elementos adicionais removidos ou parcialmente removidos para melhor mostrar as características internas do separador.

[00107] A figura 110 é uma elevação frontal do separador de partículas mostrado na figura 106.

[00108] A figura 111 é uma vista em elevação do separador de par-

tículas mostrado na figura 106 com a parede lateral do alojamento removida para mostrar as características internas do separador.

[00109] A figura 112 é uma vista lateral do separador de partículas mostrado na figura 106 (tomada a partir do lado oposto do lado a partir do qual a figura 107 foi tomada) com a parede lateral removida para mostrar características internas do separador.

[00110] A figura 113 é uma vista em perspectiva do separador de partículas mostrado na figura 106 tomada a partir de um ângulo atrás do separador e com a cobertura traseira removida para mostrar as características internas do separador.

[00111] A figura 114 é uma vista em perspectiva de uma porção do separador de partículas mostrado na figura 106 que mostra a montagem de sistemas de múltiplos bocais com relação a uma barra transversal.

[00112] A figura 115 é uma vista em perspectiva de uma porção do separador de partículas mostrado na figura 106 que mostra as relativas posições do sistema de coleta e outras partes do separador de partículas.

[00113] A figura 116 é um diagrama esquemático de uma concretização de um sistema de distribuição de fluido para um separador de múltiplos canais da presente invenção.

[00114] As figuras 117 e 118 são diagramas esquemáticos de dois diferentes sistemas de divisão de feixe de laser.

[00115] As figuras 119 e 120 são vistas em perspectiva de outro sistema de múltiplos canais da presente invenção.

[00116] As figuras 121-134 mostram resultados gráficos de diversos experimentos.

[00117] A figura 135 é um diagrama esquemático de uma concretização alternativa para um sistema de bocal da presente invenção, onde o bocal direciona o fluxo de fluido através de um tubo capilar.

[00118] A figura 136 é um diagrama esquemático de uma concretização de um sistema de separação por fotodeterioração da presente invenção.

[00119] A figura 137 é um diagrama esquemático de um sistema de separação alternativo com base na comutação fluídica que pode ser usado em um aparelho que emprega a tecnologia da presente invenção; e

[00120] A figura 138 é um diagrama esquemático de um sistema de separação alternativo com base em um fluxo de interferência de gotículas de alta velocidade que desvia os segmentos distintos selecionados do fluxo de fluido que conduz as partículas analisadas.

[00121] As partes correspondentes são indicadas pelos números de referência correspondentes por todo os desenhos. É anexada, a seguir, uma lista de peças com numerais de referência associados para cada peça. A lista de peças é provida com cabeçalhos de seção que geralmente correspondem aos cabeçalhos de seção no relatório descritivo para facilitar o uso da lista de peças. De maneira geral, cada seção da lista de peças apresenta um numeral de referência das peças que são introduzidas pela primeira vez na seção correspondente da Descrição Detalhada.

LISTA DE PEÇAS COM NUMERAIS DE REFERÊNCIA ASSOCIADOS PARA CADA PEÇA

VISÃO GERAL

- 39 coleta de sêmen
- 41 rotular sêmen
- 41A acrescentar tampão
- 43 controle de qualidade
- 47 lavagem
- 48 fluido de tingimento
- 49 tingimento

- 51 incubação
- 53 carga no dispositivo de introdução de amostra do citômetro de fluxo
- 54 acrescentar fluido de revestimento através da citometria de fluxo
- 55 separação
- 57 esperma separado de coleta
- 58A acrescentar fluido de coleta
- 58B concentrar células de esperma
- 58C acrescentar crioextensor
- 59 carregar esperma separado em canudos
- 61 criopreservação
- 63 empacotamento em nitrogênio líquido
- 65 distribuição
- 67 vendas
- 69 armazenamento
- 71 inseminação artificial

CITOMETRIA DE FLUXO

- 1 sistema (global)
- 3 suprimento de fluido catalisador
- 7 suprimento de fluido de revestimento
- 9 aparelho de citometria de fluxo apresentando capacidades de separação
- 15 sistema de distribuição de fluido
- 17 fluido catalisador
- 19 fluido de revestimento
- 21 fluxo de fluido
- 23 fluxo de partículas
- 25 feixe de radiação eletromagnética
- 31 emissão de radiação eletromagnética originária de partículas

- 33 gotículas
- 35 partículas contidas em gotículas

APARELHO DE CITOMETRIA DE FLUXO (CANAL ÚNICO)

- 101 sistema de bocal
- 103 orifício de bocal
- 105 transdutor
- 107 ruptura de gotículas
- 109 sistema óptico
- 115 localização de interrogação
- 117 fotodetector
- 119 sistema de separação
- 123 primeiro grupo ou população diferente de gotículas
- 125 segundo grupo ou população diferente de gotículas
- 2201 sistema de coleta
- 131 processador

SISTEMA DE BOCAL

- 133 corpo de fluxo cilíndrico
- 135 orifício longitudinal central
- 137 bocal
- 139 corpo de bocal na forma de funil
- 141 corpo de bocal de passagem atravessante
- 145 contrafuro internamente rosqueado
- 149 pino ou projeção rosqueada
- 155 vedação de anel em O
- 157 conduto (agulha tubular)
- 167 espaço anular (vão)
- 173 furo radial no corpo do fluxo (fluido de revestimento)
- 183 segundo furo radial (fluido de revestimento adicional)
- 189 furo central de fluido catalisador
- 191 revestimento coaxial externo de fluido

ORIENTAÇÃO DA CÉLULA

- 201 célula de esperma bovino
- 205 cabeça na forma de espátula
- 207 faces opostas largas achatadas
- 209 bordas estreitas
- 211 equador de esperma
- 213 núcleo
- 215 cauda
- 217 comprimento do núcleo
- 219 comprimento da cabeça
- 221 largura da cabeça
- 223 comprimento total
- 225 região localizada dentro do núcleo
- 227 direção do escoamento do fluxo
- 229 invólucro angular no qual o feixe de luz atinge a face larga
- R1 faixa angular
- P plano

PROJETO DO BOCAL

- 231 interior do corpo do bocal
- 233 superfície interna do corpo do bocal
- 235 primeira região axialmente afunilada
- 237 segunda região axialmente afunilada
- 239 terceira região axialmente afunilada
- 247 eixo longitudinal do bocal
- 249 quarta região interna do bocal
- 251 comprimento axial da quarta região
- 255 membro de orifício
- 257 contrafuro na extremidade dianteira do bocal
- 259 primeira zona torsional
- 261 segunda zona torsional

- 263 superfície da primeira zona torsional
- 267 superfície da segunda zona torsional
- 271 forças torsionais
- 273 comprimento axial da primeira zona torsional
- 275 comprimento axial da primeira região afunilada
- 277 comprimento axial da segunda região afunilada
- 279 comprimento axial da segunda zona torsional
- 309 superfície a montante cônica do membro de orifício
- 315 superfície a jusante cilíndrica do membro de orifício
- 317 comprimento axial da superfície cônica a montante
- 327 comprimento axial da superfície a jusante

DEFLETOR DE ORIENTAÇÃO

- 2001 defletor de orientação
- 2003 placa defletora
- 2005 suporte de defletor
- 2007 perna a montante
- 2009 perna a jusante
- 2015 linha de interseção
- 2017 eixo central do corpo de bocal
- 2019 borda curvada da perna a montante
- 2025 distância inferior em que a perna se estende a jusante
- 2027 comprimento total do suporte de defletor
- 2029 diâmetro externo do suporte de defletor
- 2031 diâmetro interno do suporte de defletor
- 2033 distância entre a linha de interseção e o centro do bocal
- 2035 extremidade a montante do defletor
- 2037 superfície inclinada do suporte de defletor
- 2039 bordas laterais da perna a jusante
- 2041 borda a jusante da perna a jusante
- 2049 vão entre a placa defletora e o suporte de defletor

- 2051 superfície interna do suporte de defletor
- 2053 volume atrás da placa defletora
- 2055 volume interno do bocal
- 2057 eixo longitudinal do suporte de defletor cilíndrico
- 2059 linha através do eixo principal do elipse D
- 2061 distância entre a agulha de injeção e o defletor
- 2067 extremidade a jusante do suporte de defletor
- 2069 pontos de contato entre o suporte de defletor e o bocal
- 2071 anéis em O
- 2077 extremidade a jusante do suporte de bocal (saliência)
- 2079 diâmetro interno da saliência
- 2081 porção do fluido de revestimento entre o fluxo de núcleo e a superfície do bocal
- 2087 seção transversal a montante (A)
- 2089 seção transversal no defletor (B)
- 2091 seção transversal no defletor (C)
- 2093 seção transversal no defletor (D)
- 2094 seção transversal a jusante do defletor (E)
- 2097 sistema de defletor perpendicular
- 2095 bolha de ar
- 2099 placa defletora perpendicular
- 2101 borda curvada da placa defletora perpendicular
- 2103 borda reta de placa defletora perpendicular
- 2105 anel em O
- 2107 projeção anular (prateleira) no bocal
- 2109 diâmetro externo de agulha de injeção de amostra (conduto)
- 2151 sistema de bocal apresentando um conduto de introdução de amostra em localização deslocada

AJUSTE E MONTAGEM DE BOCAL

- 331 suporte de bocal

- 333 primeiro estrado linear
- 337 segundo estrado linear
- 339 eixo X
- 341 eixo Y
- 343 terceiro estrado giratório
- 345 eixo Z
- 347 membro de primeiro estrado fixo (não-mostrado)
- 349 armação para o membro de primeiro estrado fixo
- 355 membro de primeiro estrado móvel
- 357 atuador (micrômetro) para o primeiro estrado
- 359 membro de segundo estrado fixo
- 361 membro de segundo estrado móvel
- 363 atuador (micrômetro) para o segundo estrado
- 365 membro de terceiro estrado fixo
- 371 membro de terceiro estrado móvel
- 373 atuador (micrômetro) para o terceiro estrado
- 375 direção geralmente a montante do fluxo contendo células
- 377 ângulo de direção a montante

TRANSDUTOR E FORMAÇÃO DE GOTÍCULAS

- 379 colar
- 381 elemento piezelétrico (não-mostrado)
- 383 terminais
- D diâmetro do fluxo

SENSOR DE RUPTURA

- 389 sensor de ruptura
- 391 microprocessador
- 393 fonte de luz
- 395 fotodisposição linear (fotodiodos)
- 401 lente para sensor de ruptura de gotículas
- 405 circuitos de Op-amp de corrente-tensão

- 407 amplificadores de rastreamento/conservação
- 409 gerador de onda senoidal (sinal de rastreamento/conservação)
- 411 conversor do analógico para o digital
- 412 sistema de câmera
- 413 estrobo
- 414A máscara
- 414B abertura na forma de ranhura na máscara

SISTEMA ÓPTICO DE EPI-ILUMINAÇÃO

- 415 sistema de epi-iluminação
- 417 instrumento de epi-iluminação
- 419 eixo óptico longitudinal
- 425 ponto de feixe
- 427 eixo de feixe de iluminação focalizado
- 429 base retangular
- 431 filtro de reflexão
- 435 lâmpada de arco ou laser
- 437 montagem de lente de condicionamento
- 439 diâmetro da abertura
- 441 parede lateral de uma câmara dicróica
- 443 câmara dicróica
- 445 anel de retenção
- 447 filtro de densidade neutra
- 449 lente cilíndrica
- 455 suporte de lente
- 457 porca de aperto
- 459 seção transversal elíptica de ponto de feixe
- 461 cliques para filtro de reflexão
- 463 suporte de filtro
- 465 face angular do suporte de filtro
- 467 aberturas no suporte de filtro

469	estrado linear para suporte de filtro
471	eixo X
473	suporte prolongado
475	atuador para estrado linear
477	filtro dicróico
479	clipes para filtro dicróico
485	armação para filtro dicróico
487	direção dianteira
489	eixo óptico longitudinal do instrumento óptico
491	montagem de lente de focalização
497	forma de onda de pulso fluorescente ou sinal emitido por célula
498	função espacial de excitação
501	adaptador de microscópio
503	abertura na parede dianteira da câmara dicróica
505	parede dianteira da câmara dicróica
507	barril de focalização
509	barris de suporte de lente
511	lente de focalização
513	direção traseira
515	ajuste de foco telescópico
517	luz emitida colimada
519	sistema de filtragem
521	filtro de emissão
523	suporte de filtro de emissão
525	abertura na parede traseira da câmara dicróica
527	parede traseira da câmara dicróica
529	montagem de película de alinhamento
531	deslizador de película de alinhamento
533	trilho para componentes de montagem de filtro
535	suporte de filtro para película de alinhamento

- 539 elemento de filtro de película
- 541 cliques para prender elemento de filtro no suporte de filtro
- 543 ângulo para película de alinhamento relativo ao eixo óptico
- 545 prendedores para prender deslizador à base
- 547 fendas paralelas na base
- 549 lente esférica
- 551 suporte para lente esférica
- 553 armação para lente esférica
- 557 prendedores para lente esférica
- 559 filtro espacial
- 561 placas de abertura
- 563 armação para placas de filtro espacial
- 567 ranhura vertical
- 571 ranhura horizontal
- 573 abertura
- 575 dimensão vertical
- 577 dimensão horizontal
- 579 volume de coleta
- 583 suporte de placa
- 587 prendedores para suporte de placa
- 589 membro de apoio para placas de abertura
- 449A montagem de instalação ajustável
- 449B fendas
- 449C fendas
- 450 epi-iluminação que reflete emissões de fluorescência
- 451 filtro dicróico

FOTODETECTOR

- 591 placa de montagem para fotodetector
- 595 prendedores para fotodetector

ÂNGULO DE INCIDÊNCIA DE FEIXE

605 distância entre localização de interrogação e orifício do bocal

609 eixo do feixe

A ângulo de incidência

PONTO DE FEIXE FOCALIZADO

L1 comprimento ao longo do eixo principal

W1 largura ao longo do eixo secundário

SISTEMA DE SEPARAÇÃO

627 dispositivo de carregamento

629 placas defletoras carregadas

631 elemento de carregamento

633 abertura no elemento de carregamento

635 suprimento de energia para placas defletoras

5001 montagem de instalação ajustável

5003 placa de ajuste de montagem de instalação

5005 apoio de montagem de instalação

5007 prendedores

5009 fenda

5011 eixo de translação

5013 eixo de translação

5015 placa de ajuste de montagem de instalação

5017 prendedores

5019 fendas

5021 suporte fixo

5023 prendedores

5025 mola

CALIBRAÇÃO DE SEPARAÇÃO AUTOMÁTICA

4201 sistema de calibração

4203 sensor de epi-iluminação

4205 cabo de fibra óptica

4207 filtro dicróico

- 4209 sistema de lente
- 4211 emissão fluorescente originária de partículas em gotícula
- 4213 fotodetector
- 4215 ponto de feixe

CORREÇÃO DE ERROS DO SISTEMA DE SEPARAÇÃO

- 5047 sistema de remoção de detritos para elemento de carregamento
- 5049 sistema de remoção de detritos para placas defletoras
- 5051 suporte para elemento de carregamento
- 5053 passagem de vácuo
- 5055 linha de vácuo
- 5057 abertura adjacente ao elemento de carregamento
- 5058 encaixe
- 5059 linha de gás comprimido
- 5061 tubulação
- 5063 passagens de ar
- 5064 aberturas
- 5065 ajuste
- 5066 lado da placa defletora

PROTEÇÃO DA AMOSTRA SEPARADA

- 4033 vaso de coleta
- 4041 mecanismo de prevenção de contaminação
- 4043 atuador pneumático
- 4045 braço de oscilação
- 4047 extremidade do braço de oscilação

SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO DE FLUIDO

- 645 bomba de seringa
- 647 linha de fluxo da bomba para o suprimento de catalisador
- 649 vaso para conter suprimento de fluido catalisador
- 651 linha da bomba para a agulha de injeção

- 657 linha de suprimento da bomba de seringa para a agulha
- 659 motor de velocidade variável
- 661 segundo vaso - para suprimento de fluido de revestimento
- 667 linha de suprimento para conectar fluido de revestimento para o furo radial no bocal
- 669 válvula de controle na linha de suprimento
- 671 sistema de pressão de gás para fluido de revestimento
- 675 fonte de gás pressurizado
- 679 linha de ar para gás pressurizado
- 681 regulador para controlar a pressão suprida para o tanque de fluido de revestimento
- 683 válvula de duas vias na linha de ar

CONTROLE

- 689 conversor do analógico para o digital
- 693 intensidade de feixe relativa experimentada pelo ponto que se move através do ponto de feixe
- 695 intensidade de pulso emitido relativa do esperma que atravessa o ponto de feixe
- d distância entre o bocal e a localização de ruptura de gotícula

PROCESSAMENTO DE SINAL

- 701 sinal de saída originário do fotodetector
- 703 sinais de relógio de geração de gotículas
- 705 processamento de sinal digital (analisador de célula digital)
- 707 sinal digital de analógico para digital
- 735 terminal de pc/computador
- 737 relógio-mestre (128 x sinal de relógio)
- 739 aquisição de dados (HH1')
- 741 parâmetros de detecção de inicialização (HH1)
- 745 parâmetros de discriminação de inicialização (HH2)
- 747 detecção de pulso digital (HH3)

749	análise de pulso digital - extração de característica (HH4)
753	área do pulso (HH5)
755	pico do pulso (HH6)
757	discriminação do pulso (HH7)
759	separação (HH8)
761	análise de desvio (HH9)
763	limite de decisão para regras de Bayes
769	inicializar
771	verificação do sistema
773	interface do usuário
775	tentar novamente (até três vezes)
777	lavar
779	controle de qualidade de contas
781	aspirar amostra
783	controle de qualidade da amostra
785	iniciar amostra
787	separação acionada
789	amostra completa
791	continuar amostra
793	separação cancelada
795	condição mais favorável de discriminação X/Y
797	ajustar discriminação X/Y
799	discriminação OK
801	condição mais favorável de taxa
803	ajustar taxa da seringa
805	taxa OK
807	verificação do sistema
809	restaurar sistema
811	sistema OK
813	fluxo operacional total exemplificativo

- 825 integrador
- 827 comparador de área/largura
- 829 calculador dinâmico de limite
- 831 discriminação de pulso
- 833 porta de entrada/saída JTAG
- 837 comparador de janela (área)
- 839 largura de pulso e lógica de disparo
- 841 separar decisão
- 843 controladores de entrada/saída
- 845 controladores escravos
- 847 separar placa de controlador
- 849 USB
- 851 SDRAM da Placa DSP
- 853 separar sinal
- 854 filtro de passagem de frequências baixas
- 855 DRAM de placa de entrada/saída
- 857 processador de entrada/saída
- 859 barra periférica de entrada/saída
- 861 separar gerador de pulso
- 863 processador de gerenciamento de dados
- 865 processador de detecção de pulso
- 867 processador de extração de característica
- 873 separar processador
- 875 RAM da placa DSP (Processador de Sinal Digital)
- OL relação inversa entre gotículas coincidentes em população utilizável comparadas às gotículas coincidentes na população inutilizável
- P1 ponto na linha OL que corresponde a 85% de pureza
- LL ponto na linha OL que corresponde a 60% de coleta de partículas desejadas
- OR faixa de operação (segmento de OL entre P1 e LL)

- 6000 dados brutos
- 6001 primeira população de células não-alinhadas
- 6003 segunda população de células não-alinhadas
- 6005 população Y alinhada
- 6007 população X alinhada
- 6010 dados brutos
- 6011 população de células não-alinhadas
- 6015 população Y alinhada
- 6017 população X alinhada

SISTEMA DE MÚLTIPLOS CANAIS

- 1001 sistema de múltiplos canais
- 1003 unidades de citometria de fluxo
- 1005 suprimento comum de partículas
- 1007 fonte comum de radiação eletromagnética
- 1009 alojamento comum
- 1011 entrada comum para controle
- 1019 saída comum
- 1021 sistema comum de distribuição de fluido
- 1023 sistema comum de controle de temperatura
- 1025 fonte comum de energia
- 1027 sistema comum de recuperação de resíduos
- 1029 sistema comum de placa defletora
- 1031 sistema comum de limpeza

ALOJAMENTO COMUM

- 1069 base
- 1071 paredes de dois lados
- 1073 par inferior de projeções
- 1075 painel de cobertura inferior
- 1077 frente do alojamento
- 1081 par superior de projeções

- 1083 painel de cobertura superior
- 1085 parte detrás do alojamento
- 1087 armação para montar múltiplas unidades de citometria
- 1089 barra transversal afixada às paredes laterais do alojamento (para conectar suportes de bocal)
- 1093 placa de montagem angulada que se estende entre as paredes laterais

SUPRIMENTO COMUM DE FLUIDO

- 1105 bomba para fluido catalisador
- 1107 suprimento comum do fluido catalisador
- 1115 sistema de pressão de gás para fluido de revestimento
- 1117 suprimento comum de fluido de revestimento
- 1121 sistema de tubulação
- 1123 vaso contendo suprimento comum de fluido catalisador
- 1125 suporte para vaso
- 1133 bloco de retenção
- 1135 cavidade para receber vaso
- 1137 segunda cavidade para material de tampão
- 1139 vaso para material de tampão
- 1141 bomba de seringa
- 1147 linha de suprimento da bomba de seringa para a tubulação
- 1149 válvula de três vias que controla o fluido catalisador e de tampão
- 1155 vaso para o suprimento comum de fluido de revestimento
- 1157 linha de suprimento proveniente do vaso de fluido de revestimento para a tubulação
- 1161 fonte de gás pressurizado
- 1163 linha de gás
- 1165 regulador em linha de gás
- 1167 válvula de duas vias para a linha de gás entre a fonte de gás e

o tanque de fluido de revestimento

1169 linha de gás para pressurizar um suprimento de solução de limpeza

1173 tanque para solução de limpeza

1175 válvula de duas vias para linha de gás para solução de limpeza

1177 tubulação

1179 bloco laminado

1181 passagens

1185 circuito de fluxo de fluido

1189 entradas conectadas à bomba da seringa

1191 entradas conectadas ao suprimento de fluido de revestimento

1193 saídas para fluido catalisador e fluido de revestimento

V1-V6 válvulas para controlar o fluxo através das passagens de tubulação

1203 membro de armação (para conectar o bloco de tubulação)

1205 encaixes rosqueados no bloco

1207 reservatório de amostra

V1A-V1D válvulas de duas vias (para controlar o fluxo de fluido para os bocais)

1217 agulha do reservatório de amostra

1221 sistema de resíduos

1223 tanque de resíduos (receptáculo)

1225 mecanismo tal como bomba de vácuo (para gerar vácuo)

1227 linhas de resíduos (conectando as válvulas V1A-V1D ao tanque de resíduos)

1233 filtro hidrofóbico (em linha conectando tanque de resíduos e bomba de vácuo)

1235 circuito de fluido para fluido de revestimento

V2A-V2D válvulas de duas vias (para controlar o fluxo de fluido de revestimento para os bocais)

1241 linha de suprimento de revestimento

1247 linhas de resíduos que conectam circuitos de fluxo de fluido de revestimento ao tanque de resíduos

SUPRIMENTO COMUM DE ENERGIA E CONTROLES

1249 suprimento comum de energia

1251 sistemas comuns de distribuição de energia

1253 entrada comum (GUI)

1255 saída comum (para o microprocessador)

CONTROLE COMUM DE TEMPERATURA

1257 sistema de controle de temperatura

1259 circuito de fluxo de fluido (para controle da temperatura)

1263 passagens de fluido (para controle da temperatura no bloco de retenção)

1265 unidade de controle

1269 passagens de fluido (para controle da temperatura na tubulação)

V6 válvula de interrupção

FEIXE DE LUZ COMUM E SISTEMA DE DIVISÃO DE FEIXE

1270 divisor de feixe

1270A primeiro feixe originário do divisor de feixe

1270B segundo feixe originário do divisor de feixe

1271 segundo divisor de feixe

1271A primeiro feixe originário do segundo divisor de feixe

1271B segundo feixe originário do segundo divisor de feixe

1272 terceiro divisor de feixe

1272A primeiro feixe originário do terceiro divisor de feixe

1272B segundo feixe originário do terceiro divisor de feixe

1273 sistema de orientação de feixe

1279 montagem de filtro inferior

1281 montagem de espelho superior

- 1285 base (para montagem de filtro inferior)
- 1289 estrado (para montagem de filtro inferior)
- 1291 mecanismo para estrado móvel (micrômetro)
- 1293 plataforma inclinável no estrado
- 1295 espelho (na plataforma)
- 1297 base (para montagem de espelho superior)
- 1299 estrado (para montagem de espelho superior)
- 1301 plataforma inclinável (para montagem de espelho superior)
- 1303 espelho (para montagem de espelho superior)
- 1305 mecanismo para mover estrado superior
- 1309 placas-alvo (afixadas à parede lateral do alojamento)
- 1311 orifício verticalmente alinhados (nas placas-alvo)
- 1315 primeiro filtro de reflexão
- 1317 segundo filtro de reflexão
- 1319 terceiro filtro de reflexão
- 1321 quarto filtro de reflexão

PLACAS DEFLETORAS COMUNS

- 1331 duas placas defletoras comuns
- 1333 armação (para montar placas defletoras comuns no alojamento)

SISTEMA MODULAR DE MÚLTIPLOS CANAIS

- 4001 sistema de múltiplos canais
- 4009 unidade de citometria modular
- 4011 alojamento para unidade modular
- 4013 alojamento comum
- 4015 laser
- 4017 sistema de divisão e orientação de feixe
- 4021 orifício para laser para entrar no alojamento modular
- 4023 placa para cobrir orifício de saída
- 4025 sistema de coleta para o sistema

SISTEMA CAPILAR DE BOCAL DE TUBO

- 1335 sistema capilar de bocal de tubo
- 1337 tubo capilar
- 1341 câmara enchida com meio de transmissão de luz

SISTEMAS DE SEPARAÇÃO ALTERNATIVOS

- 1351 sistema de separação por fotodeterioração
- 1353 segundo laser
- 1355 receptáculo de coleta
- 1357 sistema de ligação de fluido
- 1359 dispositivo de ligação de fluido
- 1361 ramificação capilar para o primeiro vaso de coleta
- 1365 ramificação capilar para o segundo vaso de coleta
- 1367 transdutor (para criar ondas de pressão para seletivamente controlar a direção do fluxo de fluido)
- 1369 tubo capilar na extremidade do bocal
- 1371 sistema de separação de fluxo de interferência de gotícula
- 1373 fluxo de interferência de gotícula de alta velocidade
- 1375 sistema de geração de gotículas para fluxo de gotículas de alta velocidade
- 1377 sistema de bocal de alta velocidade
- 1379 fluxo de fluido de alta velocidade
- 1381 transdutor para geração de fluxo de interferência de gotículas
- 1383 gotículas de alta velocidade
- 1387 placa de deflexão elétrica para deflexão de gotículas de alta velocidade
- 1389 gotículas não-carregadas
- 1391 gotículas carregadas
- 1397 segmento desviado de fluxo de fluido
- 1399 interseção de fluxo de gotículas de alta velocidade com fluxo de fluido coaxial

1403 capilares de coleta

SISTEMA DE COLETA

2201 sistema de coleta

2203 dispositivo de interceptação

2205 superfície de impacto

2207 vaso de coleta

2211 passagem de entrada de gotículas

2213 bulbo de pipeta

2215 pipeta

2217 parede interna da pipeta

2225 tubo de guia

2227 armação de sistema de coleta

2229 suporte circular

2231 parafuso de ajuste para interceptar altura do dispositivo

2233 placa de montagem

2235 parafusos de ajuste para ajuste lateral

2241 fenda lateral

2243 bandeja para conter vasos de coleta

2245 janela de saída

2247 primeiro dispositivo de interceptação

2249 segundo dispositivo de interceptação

2265 gotículas de dispersão

FLUIDO DE COLETA

2301 fluido de coleta

FILTRAÇÃO

2401 filtro

2403 vaso de coleta para filtração

2405 pasta fluida concentrada contendo células de esperma

2409 mecanismo de seringa

2411 filtro de cânula

- 2413 fluido de ressuspensão
- 2419 segundo recipiente
- 2421 seringa para experimento de filtração
- 2423 amostra para experimento de filtração
- 2425 filtro para experimento de filtração
- 2427 bomba de vácuo para experimento de filtração
- 2431 seringa para experimento de filtração II
- 2433 amostra para experimento de filtração II
- 2435 filtro para experimento de filtração II
- 2437 suporte de filtro para experimento de filtração II

CRIOPRESERVAÇÃO

- 2501 Ajustar concentração
- 2503 acrescentar crioprotetor
- 2505 acrescentar fonte de proteína
- 2507 carga nos canudos
- 2509 resfriar até a temperatura estável
- 2511 manter na temperatura estável
- 2513 resfriar através da faixa de formação de cristal de gelo
- 2517 imergir em nitrogênio líquido

SISTEMA DE COLETA COMUM

- 2801 sistema de coleta comum
- 2803 armação comum para interceptar dispositivos
- 2805 calha de resíduos
- 2807 bandeja para vasos de coleta

SISTEMA DE LASER PULSADO

- 3001 laser pulsado
- 3003 sensor de laser pulsado
- 3005 pulso de laser
- 3007 queda do tempo de vida do pulso de fluorescência
- 3009 amostra digital

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES

[00122] As concretizações descritas abaixo referem-se à coleta e ao processamento de sêmen de animal, particularmente, ao processamento de sêmen de um animal doméstico para separar as células de esperma de acordo com uma característica de DNA específica (por exemplo, teor de cromossomo X/Y para pré-selecionar o gênero da linhagem). Inúmeras tecnologias da invenção são combinadas para se atingir os resultados descritos abaixo. Entretanto, será entendido que as tecnologias da invenção descritas aqui podem ser aplicadas a outras aplicações sem se desviar do escopo desta invenção.

VISÃO GERAL

[00123] A figura 1 é um diagrama de fluxo de trabalho que proporciona um resumo das etapas em um processo exemplificativo da presente invenção. O processo se inicia com a coleta de amostras de sêmen puro de um ou mais animais machos (por exemplo, touros), na etapa 39. As amostras de sêmen são rotuladas para identificação, na etapa 41, postas em contato com um tampão, na etapa 41A, e transportadas para uma instalação de processamento. Além do tampão, podem também ser acrescentados aditivos, na etapa 41A, incluindo, por exemplo, uma fonte de energia, uma fonte de proteína, um antibiótico, e/ou uma composição que regula as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmente. Um teste de controle de qualidade opcional pode ser executado na etapa 43 para assegurar que a qualidade de cada amostra (por exemplo, motilidade de esperma) seja suficiente para indicar que o produto final provavelmente atende aos critérios de qualidade mínimos. Uma etapa de lavagem adicional pode ser executada na etapa 47. Na etapa 47A, o protocolo de tingimento que será usado para processamento é selecionado usando-se vários protocolos de tingimento para tingir porções da amostra e analisando-se então a separabilidade de cada porção para

identificar um protocolo de tingimento desejado para essa amostra específica. O tingimento, de acordo com o protocolo de tingimento selecionado, é executado na etapa 49 com o acréscimo de um fluido de tingimento 48 contendo um corante químico (por exemplo, um corante fluorescente seletivo de DNA) para cada amostra. Além do fluido de tingimento, os aditivos podem também ser acrescentados na etapa 48, incluindo, por exemplo, uma fonte de energia, uma fonte de proteína, um antibiótico, e/ou uma composição que regula as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmente. As amostras são incubadas na etapa 51 para permitir a absorção do corante pelo esperma. Depois, uma amostra é carregada no dispositivo de introdução de amostra de um citômetro de fluxo, na etapa 53. O fluido de amostra é introduzido no citômetro de fluxo juntamente com um fluido de revestimento, na etapa 54. Além do fluido de revestimento, os aditivos também podem ser acrescentados na etapa 54, incluindo, por exemplo, uma fonte de energia, uma fonte de proteína, um antibiótico, e/ou uma composição que regula as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmente. Na etapa 55, o citômetro de fluxo separa as células de esperma de acordo com uma característica de DNA específica, conforme será descrito abaixo. À medida que as células de esperma são coletadas pelo sistema de coleta do citômetro de fluxo na etapa 57, elas são acrescentadas a um vaso de coleta que contém um fluido de coleta ou crioextensor na etapa 58A. Além do fluido de coleta, podem também ser acrescentados aditivos, na etapa 58A, incluindo, por exemplo, uma fonte de energia, uma fonte de proteína, um antibiótico, e/ou uma composição que regula as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmente. Neste momento, as células de esperma estão em uma solução que foi diluída pelos vários fluidos acrescentados em todo o processo. Conseqüentemente, a população de células de esperma apresentando a caracte-

rística de DNA desejada é concentrada na etapa 58B para uso em inseminação artificial. Um crioextensor é acrescentado às células de espermatozoides separadas concentradas na etapa 58C. Além do crioextensor, podem também ser acrescentados aditivos na etapa 58C, incluindo, por exemplo, uma fonte de energia, uma fonte de proteína, um antibiótico, e/ou uma composição que regula as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmente. As células de espermatozoides são então acondicionadas em recipientes tubulares (denominados na indústria de criação de "canudos"), na etapa 59, e criopreservados, na etapa 61. O espermatozoides criopreservado é acondicionado para armazenamento em nitrogênio líquido na etapa 63. O espermatozoides criopreservado é então distribuído através de um sistema de distribuição comercial, na etapa 65, e vendido aos criadores de animais, na etapa 67. Os criadores de animal podem armazenar o espermatozoides criopreservado, na etapa 69, até que eles estejam prontos para usar o espermatozoides para a inseminação artificial de um animal fêmea (por exemplo, vaca), na etapa 71. Conforme será discutido abaixo, uma concretização da presente invenção envolve o controle de temperatura através de substancialmente todo o processo. Do mesmo modo, a execução das várias etapas dentro de limites de tempo definidos é um aspecto de outra concretização da presente invenção. Todo este processo é apenas um exemplo de como a presente invenção pode ser usada, e será entendido que algumas das etapas acima mencionadas podem ser canceladas e/ou outras acrescentadas. As células de espermatozoides separadas podem também ser usadas para a microinjeção ou outra fertilização *in vitro*, seguida pelo transplante de embrião em um recipiente de animal fêmea.

[00124] As etapas de todo o processo incorporando os avanços da presente invenção são descritas em detalhes abaixo. Enquanto um processo específico descrito está no contexto de seleção de animal de

esperma (por exemplo, esperma bovino), será entendido que os vários aspectos desta invenção são mais geralmente aplicáveis a qualquer tipo de esperma (eqüino, suíno, e outros), ainda mais geralmente aplicáveis a qualquer tipo de células, e ainda mais geralmente aplicáveis a qualquer tipo de partículas, orgânicas e inorgânicas, incluindo partículas de látex, partículas magnéticas, cromossomos, elementos subcelulares, protoplastos, e partículas de amido. Estas partículas se encontram, em geral dentro de uma faixa de tamanho de 0,5 a 200 microns, embora a tecnologia desta invenção não seja limitada a esta faixa.

COLETA E DILUIÇÃO DE AMOSTRA

COLETA DE AMOSTRA

[00125] A amostra de esperma a ser separada pode ser uma amostra recentemente coletada a partir de um animal de fonte, tal como bovino, eqüino, suíno, ou outra fonte de mamífero, ou uma amostra descongelada anteriormente criopreservada. Além disso, a amostra pode ser uma única ejaculação, múltiplas ejaculações reunidas de um mesmo mamífero, ou múltiplas ejaculações reunidas de dois ou mais animais.

[00126] Vários processos de coleta são conhecidos e incluem o processo de mão enluvada, o uso de uma vagina artificial, e eletroejaculação. O esperma é preferivelmente coletado ou rapidamente transferido para um recipiente isolado para impedir a rápida mudança de temperatura das temperaturas fisiológicas (tipicamente de cerca 35°C a cerca de 39°C). A ejaculação tipicamente contém cerca de 0,5 a 1,5 bilhão de espermatozoides por mililitro, dependendo das espécies e animal específico.

[00127] Não obstante o método de coleta, uma porção pode ser extraída da amostra de esperma e avaliada quanto às diversas características, tais como, por exemplo, a concentração de esperma, a motilidade do esperma, a motilidade progressiva do esperma, amostra de

pH, a integridade de membrana do esperma, e a morfologia do esperma. Estes dados podem ser obtidos pelo exame do esperma usando, por exemplo, o Analisador de Motilidade Hamilton-Thorn (IVOS), de acordo com procedimentos padrão e bem-conhecidos (vide, por exemplo, Farrel e outros *Theriogenology* (1998) 49(4): 871-9, e as Patentes U.S. Nºs 4.896.966 e 4.896.967).

DILUIÇÃO

[00128] A amostra de esperma pode ser combinada com um tampão (na forma de um sólido ou solução) para formar uma suspensão de esperma. Dentre outras coisas, o tampão pode aumentar a viabilidade do esperma com o amortecimento da suspensão contra as mudanças significativas no pH ou pressão osmótica. De maneira geral, um tampão não é tóxico às células e é compatível com o corante usado para tingir as células. Tampões exemplificativos incluem fosfatos, difosfatos, citratos, acetatos, lactatos, e combinações dos mesmos. Os tampões atualmente preferidos incluem TCA, TEST, citrato de sódio, HEPES, TL, TES, monohidrato de ácido cítrico, HEPEST (Gradipore, St. Louis, MO), PBS (Johnson e outros *Gamete Research*, 17:203-212 (1987), e PBS de Dulbecco (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)).

[00129] Um ou mais tampões podem ser combinados entre si ou com aditivos, conforme discutido abaixo, para formar uma solução tampão, a solução tampão combinada com amostra de esperma formando uma suspensão de esperma. Uma solução tampão pode também conter um ou mais aditivos, conforme descrito em maiores detalhes abaixo. Soluções tampões exemplificativas são descritas na Tabela I. As soluções tampões preferidas incluem uma solução compreendendo 3% de base TRIS, 2% de monohidrato de ácido cítrico, e 1% de frutose (p/v) em água em um pH de cerca de 7,0, uma solução indicada como TCAnº1 na Tabela 1, e uma solução indicada como TCAnº2 na Tabela 1.

TABELA 1. SOLUÇÕES TAMPÕES

COMPONENTES	TCA nº 1	TCA nº 2	TESTE	Citrato de Na	HEPES	TL
Cloreto de sódio (NaCl)					7,6g	5,84g
Cloreto de potássio (KCl)					0,3g	0,23g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)						2,1g
fostato de sódio monobásico (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)						0,04g
(+)-2-ácido hidroxipropiônico (lactato Na)						3,68ml
Cloreto de magnésio (MgCl ₂)					0,1g	0,08g
N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanossulfônico) (HEPES)					2,38g	2,38g
tris(hidroximetil) aminometano (base TRIS)	30,3g	32,02g	10,28g			
monohidrato de ácido cítrico	15,75g	18,68g				
dihidrato de citrato de Na				29g		
ácido 2-[(2-hidróxi-1,1-bis[hidroximetil]etil) aminoetanossulfônico (ES)			43,25g			
frutose	12,5g	2,67g		10g	2,52g	
D-glucose			2g			
esteptamicina			0,25g			
penicilina G			0,15g			
água	1 litro	1 litro	1 litro	1 litro	1 litro	1 litro
pH alvo	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35
Osmolalidade alvo (miliosmol/kg H ₂ O)	~314	~300	~302	~316	~298	~296

[00130] Alternativamente, o esperma pode ser combinado com um inibidor metabólico para formar uma suspensão de esperma inibida. Inibidores metabólicos fazem com que as células de esperma emulem as células de esperma do epidídimo de um mamífero, tal como, por exemplo, um touro, com a simulação do ambiente de fluido do epidídimo ou trato epididímico do mamífero. Tal inibidor reduziria ou inibiria a motilidade e a atividade metabólica do esperma. Inibidores exemplificativos desta classe incluem inibidores com base em carbonato, tais como, por exemplo, aqueles descritos em Salisbury & Graves J. Re-

prod. Fertil, 6:351-359 (1963). Um inibidor preferido deste tipo compreende NaHCO_3 , KHCO_3 e $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Um inibidor mais preferido deste tipo compreende 0,204 g de NaHCO_3 , 0,433g de KHCO_3 , e 0,473 de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 25 ml de água purificada (0,097 mol/L de NaHCO_3 , 0,173 mol/L de KHCO_3 , 0,090 mol/L de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em água).

[00131] Além de um tampão, a suspensão de esperma pode também conter uma faixa de aditivos para intensificar a viabilidade ou a motilidade do esperma. Aditivos exemplificativos incluem fontes de energia, fontes de proteína, antibióticos, e composições que regulam as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmente. Um ou mais destes aditivos podem ser introduzidos no tampão ou na solução tampão antes da formação da suspensão de esperma ou, alternativamente, podem ser separadamente introduzidos na suspensão de esperma.

[00132] Uma ou mais fontes de energia podem ser acrescentadas para minimizar ou impedir que as células de esperma oxidem fosfolípidos intracelulares oxidantes e outros componentes celulares. Fontes de energia exemplificativas incluem monossacarídeos, tais como frutose, glicose, galactose e manose, e dissacarídeos, tais como sacarose, lactose, maltose, e trealose, bem como outros polissacarídeos. Por exemplo, a suspensão de esperma resultante pode incluir cerca de 1% (p/v) a cerca de 4% (p/v) de fonte(s) de energia. Caso incluída, a fonte de energia é preferivelmente frutose e a suspensão de esperma contém cerca de 2,5% (p/v).

[00133] Para minimizar o choque de diluição, prover suporte para as células, ou dispersar as células por toda a suspensão, uma fonte de proteína poderá também ser incluída no tampão, na solução tampão, ou na suspensão de esperma. Fontes de proteína exemplificativas incluem a gema de ovo, o extrato de gema de ovo, leite (incluindo ho-

mogeneizado e desnatado por calor), extrato de leite, proteína de soja, extrato de proteína de soja, albumina de soro, albumina de soro bovino, suplemento substituto de soro humano, e combinações dos mesmos. A albumina, e mais particularmente, a albumina de soro bovino (BSA), é uma fonte de proteína preferida. Por exemplo, caso incluída, a BSA pode se apresentar na suspensão de esperma em uma quantidade menor que cerca de 5,0% (p/v), preferivelmente menor que cerca de 2% (p/v), mais preferivelmente menor que cerca de 1% (p/v), e mais preferivelmente ainda em uma quantidade de cerca de 0,1 (p/v).

[00134] O uso de uma fonte de proteína, tal como BSA, pode sozinha inibir o processo de capacitação em uma porcentagem das células de esperma na suspensão. É preferido que este processo aconteça no trato reprodutivo feminino. Portanto, a fim de inibir a iniciação de capacitação durante a diluição, bem como durante o tingimento e a separação subseqüentes, pode ser incluída uma fonte de proteína alternativa ou um substituto de proteína na suspensão de esperma. A fonte de proteína alternativa ou o substituto de proteína apresenta os efeitos vantajosos de uma típica fonte de proteína, tal como a BSA, além da capacidade de inibir a iniciação de capacitação em uma porcentagem maior das células na suspensão de esperma. Exemplos de fontes de proteína alternativas incluem suplemento substituto de soro humano (SSS) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) e BSA realçadora de colesterol, enquanto um exemplo de um substituto de proteína inclui um álcool polivinílico, tal como, por exemplo, um álcool polivinílico de viscosidade de baixa a média geralmente de um peso molecular de cerca de 30.000 a cerca de 60.000. Geralmente, caso incluídas, estas composições se apresentarão nas mesmas quantidades que descrito acima com relação à BSA, com um teor total de albumina do tampão ou solução tampão geralmente não excedendo cerca de 5,0% (p/v).

[00135] Um antibiótico pode ser acrescentado à suspensão de es-

perma a fim de inibir o crescimento de bactérias. Antibióticos exemplificativos incluem, por exemplo, a tilosina, a gentamicina, a lincomicina, a espectinomicina, a LincoSpectin® (lincomicina, cloridrato-espectinomicina), penicilina, estreptomicina, ticarcilina, ou qualquer combinação das mesmas. O antibiótico pode se apresentar em uma concentração de cerca de 50 g a cerca de 800 g por ml de sêmen, não obstante se o sêmen é puro, tampão, ou contém substâncias adicionais, tais como, por exemplo, qualquer dos aditivos mencionados aqui. Os Serviços de Sêmen Certificados (CSS) e a Associação Nacional de Criadores de Animais (NAAB) promulgaram diretrizes referentes ao uso de antibiótico com relação à coleta e ao uso de espermatozoides.

[00136] Uma composição que regula as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmente pode ser também incluída na suspensão de espermatozoides. Tal composição pode prover um efeito protetor às células de espermatozoides, tal como, por exemplo, com a manutenção da viabilidade ou motilidade progressiva do espermatozoides. Exemplos de tal composição incluem, por exemplo, piruvato, vitamina K, ácido lipóico, glutathione, flavinas, quinonas, superóxido dismutase (SOD), e imitações de SOD. Caso incluída na suspensão de espermatozoides, a dita composição pode se apresentar em uma concentração suficiente para efetuar o efeito protetor sem afetar prejudicialmente a saúde do espermatozoides. Faixas de concentração exemplificativas incluem de cerca de 10 M a cerca de 50mM dependendo de tais fatores como a composição específica que é usada ou a concentração de espermatozoides na suspensão. Por exemplo, o piruvato pode se apresentar na suspensão de espermatozoides em uma concentração de cerca de 1mM a cerca de 50mM, preferivelmente de cerca de 2,5mM a cerca de 40mM, mais preferivelmente de cerca de 15mM a cerca de 25mM, ainda mais preferivelmente de cerca de 10mM a cerca de 15mM, ainda mais preferivelmente de cerca de 15mM, e, mais preferivelmente de cerca de 10mM. A

vitamina K pode se apresentar na suspensão de esperma em uma concentração de cerca de 1 M a cerca de 100 M, preferivelmente de cerca de 10 M a cerca de 100 M, e mais preferivelmente de cerca de 100 M. O ácido lipóico pode se apresentar na suspensão de esperma em uma concentração de cerca de 0,1mM a cerca de 1mM, preferivelmente de cerca de 0,5mM a cerca de 1mM, e, mais preferivelmente de cerca de 1mM.

TINGIMENTO DAS CÉLULAS A SEREM SEPARADAS

[00137] De maneira geral, as células de esperma podem ser tingidas com a formação de uma mistura de tingimento compreendendo células de esperma, um tampão e um corante. As células de esperma podem ser derivadas de uma amostra de sêmen recentemente obtida, conforme discutido acima com relação à coleta e diluição de amostra, ou a partir de uma amostra de sêmen criopreservada descongelada.

[00138] Se a amostra de sêmen for uma amostra descongelada anteriormente criopreservada, o esperma será preferivelmente descongelado imediatamente antes do tingimento. De modo geral, um canudo ou outro vaso de criopreservação contendo o esperma congelado pode ser colocado em um banho d'água, a temperatura do qual está preferivelmente acima da temperatura de transição de vidro da membrana de célula de esperma (isto é, cerca de 17°C), mas não tão grande para adversamente afetar a saúde do esperma. Por exemplo, o esperma congelado pode ser descongelado por meio da imersão do vaso de criopreservação em um banho d'água mantido em uma temperatura de cerca de 17°C a cerca de 40°C por um período de cerca de 30 segundos a cerca de 90 segundos.

[00139] Uma vez obtidas, as células de esperma podem ser introduzidas na mistura de tingimento na forma de sêmen puro ou na forma de uma suspensão derivada do mesmo, por exemplo, uma suspensão de esperma conforme discutido acima com relação à coleta e diluição

de amostra.

[00140] O corante pode se apresentar na forma de uma composição pura sólida ou líquida. O corante pode também ser dissolvido ou disperso em um líquido não-tampão para formar uma solução de corante. Alternativamente, o corante pode se apresentar na forma de uma suspensão de corante compreendendo um corante e um tampão ou solução tampão que é biologicamente compatível com as células de esperma. Uma faixa exemplificativa de tampões ou soluções tampão é discutida acima com relação à coleta e diluição de amostra. Por exemplo, dentre os tampões que podem ser usados está uma solução tampão TCA que compreende 3% de base TRIS, 2% de monohidrato de ácido cítrico, e 1% de frutose em água em um pH de cerca de 7,0, ou uma solução inibidora com base em carbonato compreendendo 0,204 g de NaHCO_3 , 0,433 g de KHCO_3 , e 0,473 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 25 ml de água purificada (0,907 mol/L de NaHCO_3 , 0,173 moles/L de KHCO_3 , 0,090 moles/L de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em água). Portanto, por exemplo, uma mistura de tingimento pode ser formada com a combinação de sêmen puro com um corante. Alternativamente, a mistura de tingimento pode ser formada com a combinação de sêmen puro com um tampão ou solução tampão e um corante. Adicionalmente, a mistura de tingimento pode ser formada com a combinação de uma suspensão de esperma com um corante.

[00141] A mistura de tingimento pode ser formada com o uso de um ou mais corantes seletivos de DNA excitáveis de luz visível ou UV, conforme anteriormente descrito na Patente U.S. Nº 5.135.759 e em WO 02/41906. Os corantes seletivos excitáveis de luz UV exemplificativos incluem Hoechst 33342 e Hoechst 33258, cada um dos quais sendo comercialmente disponível pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Corantes excitáveis de luz visível exemplificativos incluem SYBR-14, comercialmente disponíveis pela Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR)

e conjugado de bisbenzimidaz-BODIPY® 6-[[3-((2Z)-2-[[1-(difluoroboril)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il]metileno]-2H-pirrol-5-il)propanoil]amino}-N-[3-metil{3-[[4-[6-4-metilpiperazin-1-il]-1H,3'H-2,5'-bibenzimidazol-2-il]fenóxi}acetil)amino]propil]amino)propil]hexanamida ("BBC") descritos em WO 02/41906. Cada um destes corantes pode ser usado sozinho ou em combinação; alternativamente, podem ser usados outros corantes excitáveis de luz visível ou UV permeantes de célula, sozinhos ou em combinação com os corantes acima mencionados, uma vez que o corante não afeta prejudicialmente a viabilidade das células de espermatozoides a um grau inaceitável quando usado em concentrações que permitem a separação, conforme descrito em algum outro lugar.

[00142] A concentração preferida de corante seletivo de DNA na mistura de tingimento é uma função de uma faixa de variáveis que incluem a permeabilidade das células com relação ao corante selecionado, a temperatura da mistura de tingimento, a quantidade de tempo permitido para que o tingimento ocorra, e o grau de enriquecimento desejado na etapa de separação subsequente. Em geral, a concentração de corante é preferivelmente suficiente para se alcançar o grau desejado de tingimento em um período razoavelmente curto de tempo sem substancialmente prejudicar a viabilidade do espermatozoide. Por exemplo, a concentração de Hoechst 33342, Hoechst33258, SYBR-4, ou BBB na mistura de tingimento estará geralmente entre cerca de 0,1 μM a cerca de 1,0 μM , preferivelmente de cerca de 0,1 μM a cerca de 700 μM , e, mais preferivelmente de cerca de 100 μM a cerca de 200 μM . Conseqüentemente, de acordo com um conjunto de condições de tingimento, a concentração de Hoechst 3342 é preferivelmente de cerca de 100 μM . De acordo com outro conjunto de condições de tingimento, a concentração de Hoechst 33342 é de cerca de 150 μM . De acordo com ainda outro conjunto de condições de tingimento, a concentração é preferivelmente de cerca de 200 μM .

[00143] Além do tampão, outros aditivos podem ser incluídos na mistura de tingimento para realçar a viabilidade ou a motilidade do espermatozoide; estes aditivos podem ser providos como parte da fonte de espermatozoide, da fonte de corante, ou separadamente à mistura de tingimento. Tais aditivos incluem fontes de energia, antibióticos, composições que regulam as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmente, e plasma de sêmen, os três primeiros dos quais são discutidos acima com relação à coleta e diluição de amostra, e o último dos quais é discutido abaixo com relação aos fluidos de coleta. Tais aditivos podem ser acrescentados durante as técnicas de tingimento de acordo com os mesmos.

[00144] Em particular, foi observado que a inclusão de uma composição que regula as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmente na mistura de tingimento pode ajudar a manter a viabilidade do espermatozoide em temperaturas de tingimento elevadas, em concentrações de corante elevadas, e em períodos de tingimento maiores, ou qualquer combinação dos mesmos. Exemplos destas composições e o uso das mesmas são discutidos acima com relação aos tampões e diluentes. Tais composições podem ser acrescentadas durante as técnicas de tingimento de acordo com as mesmas.

[00145] A mistura de tingimento pode ser mantida em qualquer temperatura de uma faixa de temperaturas; tipicamente, esta estará dentro de uma faixa de cerca de 4°C a cerca de 50°C. Por exemplo, a mistura de tingimento pode ser mantida em uma temperatura "relativamente baixa", isto é, uma temperatura de cerca de 4°C a cerca de 30°C; nesta concretização, a temperatura é preferivelmente de cerca de 20°C a cerca de 30°C, mais preferivelmente de cerca de 25°C a cerca de 30°C, e, mais preferivelmente ainda de cerca de 28°C. Alternativamente, a mistura de tingimento pode ser mantida dentro de uma faixa de temperatura "intermediária", isto é, uma temperatura de cerca

de 30°C a cerca de 39°C; nesta concretização, a temperatura está preferivelmente em cerca de 34°C a cerca de 39°C, e, mais preferivelmente, de cerca de 37°C. Além disso, a mistura de tingimento pode ser mantida dentro de uma faixa de temperatura "relativamente alta", isto é, uma temperatura de cerca de 40°C a cerca de 50°C; nesta concretização, a temperatura é preferivelmente de cerca de 40°C a cerca de 45°C, mais preferivelmente de cerca de 40°C a cerca de 43°C, e, mais preferivelmente ainda de cerca de 41°C. A seleção de uma temperatura preferida geralmente depende de uma faixa de variáveis, incluindo, por exemplo, a permeabilidade das células ao(s) corante(s) que é(são) usado(s), a concentração do(s) corante(s) na mistura de tingimento, a quantidade de tempo em que as células serão mantidas na mistura de tingimento, e o grau de enriquecimento desejado na etapa de separação.

[00146] A absorção do corante pelas células de esperma na mistura de tingimento pode continuar por um período de tempo suficiente para se obter o grau desejado de tingimento de DNA. Esse período é tipicamente um período suficiente para que o corante seja ligado ao DNA das células de esperma, de tal modo que as células de esperma conduzindo cromossomos x e y possam ser separadas com base na intensidade de fluorescência diferente e mensurável entre os dois. De maneira geral, isto não levará mais de cerca de 160 minutos, preferivelmente não mais de cerca de 90 minutos, ainda mais preferivelmente não mais de cerca de 60 minutos, e, mais preferivelmente de cerca de 5 minutos a cerca de 40 minutos.

[00147] Conseqüentemente, em uma concretização, uma mistura de tingimento é formada compreendendo células de esperma e um corante em uma concentração de cerca de 100 µM a cerca de 200 µM, e a mistura de tingimento é mantida por um período de tempo em uma temperatura de cerca de 41°C. Em outra concretização, a mistura de

tingimento adicionalmente compreende piruvato em uma concentração de cerca de 10 mM, vitamina K em uma concentração de cerca de 100 μ M, ou ácido lipóico em uma concentração de cerca de 1 mM.

[00148] Em ainda outra concretização, um mistura de tingimento é formada compreendendo células de esperma e um corante em uma concentração de cerca de 100 μ M a cerca de 200 μ M, e a mistura de tingimento é mantida por um período de tempo em uma temperatura de cerca de 28°C. Em outra concretização, a mistura de tingimento compreende piruvato em uma concentração de cerca de 10 mM, vitamina K em uma concentração de cerca de 100 μ M, ou ácido lipóico em uma concentração de cerca de 1 mM.

[00149] Em ainda outro exemplo, uma mistura de tingimento é formada compreendendo células de esperma, um inibidor metabólico compreendendo 0,204 g de NaHCO_3 , 0,433g de KHCO_3 , e 0,473 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 25 mL de água purificada (0,097 mol/L de NaHCO_3 , 0,173 mol/L de KHCO_3 , 0,090 mol/L $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em água), e um corante em uma concentração de cerca de 100 μ M a cerca de 200 μ M, a mistura de tingimento sendo mantida por um período de tempo em uma temperatura de cerca de 28°C. Em outra concretização, a mistura de tingimento é mantida por um período de tempo em uma temperatura de cerca de 41°C.

FLUIDO DE REVESTIMENTO

[00150] Para separar as células de esperma, as células tingidas são introduzidas como um fluido de amostra no bocal de um citômetro de fluxo, conforme descrito abaixo. Como parte do processo, o fluido de amostra é tipicamente circundado por um fluido de revestimento. O fluido de revestimento permite que as células de esperma no fluido de amostra sejam ordenadas em uma única linha de fila, conforme discutido abaixo. O fluido de revestimento é coletado juntamente com as células de esperma pelo sistema de coleta do citômetro de fluxo e,

portanto, faz parte do ambiente pós-separação para as células de es-
perma. Desse modo, é desejável que o fluido de revestimento apre-
sente um efeito protetor às células de esperma com o contato das cé-
lulas de esperma pelo fluido de revestimento.

[00151] O fluido de revestimento geralmente compreende um tam-
pão ou solução. Exemplos de tampão e soluções tampões, e concen-
trações ilustrativas dos mesmos, que podem ser usados no fluido de
revestimento são descritos acima com relação à coleta e diluição de
amostra. Em uma concretização específica, o fluido de revestimento
compreende 0,96% de solução salina amortecedora de fosfato de Dul-
becco (p/v), 0,1% de BSA (p/v), em água de um pH de cerca de 7,0.

[00152] Opcionalmente, o fluido de revestimento pode também con-
ter uma faixa de aditivos que são benéficos à viabilidade ou motilidade
do esperma. Tais aditivos incluem, por exemplo, uma fonte de energia,
uma fonte de proteína, um antibiótico, uma composição que regula as
reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmen-
te, uma fonte de proteína alternativa, e álcool polivinílico. Cada um
destes aditivos, e exemplos dos mesmos, é discutido acima com rela-
ção à coleta e diluição de amostra. Tais aditivos podem ser acrescen-
tados ao fluido de revestimento de acordo com os mesmos.

[00153] O fluido de revestimento pode opcionalmente ser filtrado
antes da etapa de separação. Os contaminantes que podem estar pre-
sentes no fluido de revestimento, tais como particulados não-solúveis,
podem interferir com a separação. Por isso, o fluido de revestimento
pode ser filtrado antes de sua introdução em um citômetro de fluxo.
Tais filtros e métodos de usar os mesmos são bem-conhecidos na téc-
nica. De maneira geral, o filtro é uma membrana de cerca de 0,1 mí-
cron a cerca de 0,5 micron, preferivelmente de cerca de 0,2 micron a
cerca de 0,3 micron, e, mas preferivelmente de cerca de 0,2 micron.

[00154] As células tingidas podem ser introduzidas no fluido de re-

vestimento em qualquer momento subsequente ao tingimento. Tipicamente, um fluxo de células tingidas no fluido de amostra é injetado em um fluxo de fluido de revestimento dentro do bocal do citômetro de fluxo. Inicialmente, não há qualquer contato do fluido de amostra e do fluido de revestimento devido ao fluxo laminar dos fluidos, conforme discutido em maiores detalhes abaixo. É desejável que o fluido de amostra e o fluido de revestimento permaneçam como fluxos de escoamento substancialmente discreto até depois que as partículas (por exemplo, as células de esperma tingidas) no fluido de amostra tenham sido analisadas. No mesmo ponto, contudo, o fluido de revestimento e as células do fluido de amostra entram em contato mútuo. Por exemplo, em um citômetro de fluxo de separação de gotículas (discutido abaixo) o fluido de revestimento e o fluido de amostra começam a entrar em contato mútuo à medida que gotículas estão sendo formadas a jusante da localização de interrogação.

[00155] No momento da introdução das células de esperma e do fluido de revestimento, tanto as células tingidas como o fluido de revestimento podem estar em uma temperatura de cerca de 4°C a cerca de 50°C. O fluido de revestimento e as células tingidas podem estar na mesma temperatura ou em temperaturas diferentes, com cada qual estando em uma temperatura mais alta do que a outra. Conseqüentemente, em uma concretização, no momento da introdução das células tingidas e do fluido de revestimento, tanto as células como o fluido de revestimento estão na mesma temperatura; por exemplo, em uma temperatura "relativamente baixa", tal como, por exemplo, em cerca de 5°C a cerca de 8°C; em uma temperatura "intermediária", tal como, por exemplo, em cerca de 25°C a cerca de 30°C; ou em uma temperatura "relativamente alta", tal como, por exemplo, em cerca de 40°C a cerca de 43°C. Em outra concretização, as células de esperma estão em uma temperatura mais alta do que o fluido de revestimento, tal como,

por exemplo, as células que estão em cerca de 40°C a cerca de 43°C e o fluido de revestimento que está em uma temperatura ambiente ou em uma temperatura de cerca de 5°C. Em ainda outra concretização, as células tingidas estão em uma temperatura mais baixa do que o fluido de revestimento.

CITOMETRIA DE FLUXO

[00156] Uma concretização da presente invenção emprega tecnologias da invenção na citometria de fluxo para analisar e separar as células de esperma. Com referência, agora, às figuras 2 e 3, uma concretização de um sistema de citometria de fluxo da presente invenção é indicada em sua totalidade pelo numeral de referência 1. Conforme irá aparecer, o sistema de citometria de fluxo 1 é útil para classificar e separar partículas, tais como células de esperma, de acordo com as características selecionadas. Em geral, o sistema 1 compreende um suprimento 3 de fluido catalisador 17 contendo partículas a serem separadas, um suprimento 7 de fluido de revestimento 19, um aparelho de citometria de fluxo apresentando capacidades de separação, geralmente indicado por 9, e um sistema de distribuição de fluido 15 para dispensar o catalisador 17 e os fluidos de revestimento 19 dos respectivos suprimentos 3, 7 sob pressão ao aparelho de citometria de fluxo 9. O aparelho de citometria de fluxo 9 é adaptado para receber o catalisador 17 e os fluidos de revestimento 19, para combinar os fluidos 17, 19 para criar um fluxo de fluido pressurizado 21, para direcionar o fluxo 21 que conduz as partículas através de um feixe focalizado de radiação eletromagnética 25 (por exemplo, luz de laser UV), e para analisar a radiação eletromagnética 31 (por exemplo, luz fluorescente) emitida pelas partículas que passam através do feixe focalizado 25. O aparelho 9 também funciona para romper o fluxo 21 em gotículas 33 contendo partículas a serem avaliadas, e para separar as gotículas 33 com base nas medições acima mencionadas de acordo com uma ou

mais características das partículas contidas nas gotículas 33. Enquanto esta invenção pode ser usada para analisar e preferivelmente separar qualquer tipo de partícula, ela tem aplicação específica para separar células de acordo com uma ou mais características das células (por exemplo, tamanho, teor de DNA, forma, densidade, sequência de genes, etc.). Esta invenção é especialmente adequada para separar células de esperma de animais para uso comercial pela indústria de produção animal para inseminação *in vivo* ou *in vitro*, conforme discutido em maiores detalhes abaixo.

APARELHO E MÉTODO PARA SEPARAÇÃO DE CANAL ÚNICO

APARELHO DE CITOMETRIA DE FLUXO

[00157] O aparelho de citometria de fluxo 9 mostrado na figura 3 compreende um sistema de bocal, geralmente indicado por 101, para dispensar um fluxo de fluido 21 contendo partículas (por exemplo, células de esperma tingidas) através de um orifício de bocal 103 sob pressão com as células substancialmente em fila única e, no caso de células de esperma, com cabeças assimétricas das células de esperma substancialmente em uma orientação desejada que será descrita. Como nos sistemas de separação de gotículas de citometria de fluxo convencionais, um transdutor 105 é provido oposto ao orifício de bocal 103 para introduzir energia acústica no fluxo de fluido 21 que faz com que o fluxo 21 se rompa em gotículas 33 contendo células individuais em uma localização de "ruptura de gotículas" 107 espaçada do orifício de bocal 103. O sistema 1 também inclui um sistema óptico, geralmente indicado por 109, para focalizar um feixe de radiação eletromagnética 25 (por exemplo, luz de laser visível ou de UV de 350-700 nm) no fluxo de fluido 21 em uma localização de "interrogação" 115 que, na concretização descrita, está entre o orifício de bocal 103 e a localização de ruptura de gotículas 107. Desse modo, a concretização descrita é um sistema de jato no ar. Em outras concretizações, a localização de

interrogação 107 poderia estar dentro do orifício de bocal 103 ou a montante do orifício 103. Em qualquer caso, as células são adaptadas para passarem através do feixe de luz 25 na localização de interrogação 107, resultando na excitação de uma tingimento química (ou outro meio indicador) nas células para produzir emissões de fluorescência 31 apresentando um comprimento de onda diferente daquele do feixe 25 (por exemplo, se a luz de iluminação 25 apresentar um comprimento de onda de cerca 350 a 370 nm, as emissões fluorescentes 31 poderão ter um comprimento de onda de cerca de 460 nm). Um fotodetector 117 é operável para detectar estas emissões 31 e para convertê-las em sinais elétricos que são processados e usados para a classificação das células de acordo com as características selecionadas, tal como o teor de cromossomo X/Y das células de esperma. O aparelho de citometria de fluxo 9 adicionalmente compreende um sistema de separação, geralmente indicado por 119, para separar as gotículas 33 em diferentes grupos ou populações (por exemplo, duas populações 123, 125), de acordo com a classificação das células contidas nas gotículas 33, e um sistema de coleta, geralmente indicado por 2201 (figura 2), para coletar as gotículas 33 e manter a segregação das diferentes populações 123, 125.

[00158] A operação do sistema 1 é controlada por um processador 131, tal como um microprocessador ou outro controle e/ou processador digital ou analógico, ou combinações dos mesmos, que controla as diversas funções dos componentes do sistema 1 em uma maneira a ser descrita. Significativamente, o processador 131 é também responsivo à informação de análise de partículas para controlar a saída do sistema 1 com base em um controle selecionado e estratégias de separação envolvendo os diferentes parâmetros, incluindo a pureza desejada de uma das populações separadas de partículas, a quantidade (ou porcentagem) aceitável de partículas desejadas em uma ou mais

populações, conforme comparado à quantidade (ou porcentagem) de partículas desejadas em uma ou mais das outras populações, e outros parâmetros, conforme será discutido mais tarde.

[00159] Os vários componentes do sistema 1 são descritos em detalhes abaixo.

SISTEMA DE BOCAL

[00160] Com referência às figuras 4 e 5, o sistema de bocal 101 compreende, em uma concretização exemplificativa, um corpo de fluxo geralmente cilíndrico 133 que apresenta um orifício longitudinal central 135 através do mesmo, e um bocal 137 no corpo de fluxo 133 apresentando um corpo de bocal na forma de funil 139. Uma passagem 141 se estende através do corpo de bocal 139 coaxial com o orifício 135 no corpo de fluxo 133 e termina no orifício de bocal acima mencionado 103 na extremidade dianteira do bocal 137. O corpo de bocal 139 apresenta um contrafuro internamente rosqueado 145 em sua extremidade traseira para rosqueadamente receber um pino ou projeção rosqueada 149 na extremidade dianteira do corpo de fluxo 133 para removivelmente conectar o bocal 137 ao corpo de fluxo 133, a conexão sendo vedada por uma vedação de anel em O 155. Será entendido que o bocal pode ser removivelmente conectado ao corpo de fluxo de outras maneiras ou, alternativamente, as partes poderiam ser integralmente formadas como uma peça.

[00161] As partículas são dispensadas no bocal 137 por meio de um conduto 157 posicionado coaxialmente no buraco 135 do corpo de fluxo 133. O diâmetro externo do conduto 157 é menor que o diâmetro interno do orifício 135, de modo que um espaço anular 167 seja formado em torno do conduto 157. Em uma concretização específica, o conduto 157 é uma agulha tubular (por exemplo, uma agulha de calibre 16. apresentando um diâmetro interno de 0,254 mm (0,01 polegada) apresentando uma extremidade dianteira que se estende para o

contrafuro 145 na parte detrás do bocal 137. A extremidade traseira do conduto 157 é conectada ao sistema de distribuição de fluido 15 para distribuição do fluido catalisador 15 (por exemplo, uma mistura de tingimento contendo células de esperma) no conduto 157. O espaço anular 167 que circunda o conduto 157 é conectado por meio de um orifício radial 173 no corpo de fluxo 133 ao sistema de distribuição de fluido 15 para distribuição do fluido de revestimento 19 no espaço anular 167. Conforme mostrado nas figuras 3 e 5, um segundo furo radial opcional 183 pode ser provido no corpo de fluxo 133 conectando o espaço anular 167 a outra linha (não-mostrada) para suprimento do fluido de revestimento adicional 19 ao bocal 137.

[00162] Como nos sistemas de citometria de fluxo convencionais, o fluido de revestimento 19 é introduzido no espaço anular 176 que circunda o conduto 157. A velocidade do fluido de revestimento 19 à medida que ele flui além da ponta do conduto 157 é muito maior que a velocidade do fluido catalisador 17 que sai do conduto 157, de modo que o fluido catalisador 157 e as células (por exemplo, as células de esperma) contidas no mesmo sejam acelerados pelo fluido de revestimento 19 na direção do orifício 103 do bocal 137. Esta aceleração funciona para espaçar as células geralmente em uma única disposição em fila para análise de separação pelo sistema óptico 109. O fluido de revestimento 19 circunda o fluido catalisador 17, resultando no fluxo de fluido 21 apresentando um núcleo central 189 do fluido catalisador 17 e um revestimento coaxial externo 191 do fluido de revestimento 19 que circunda o núcleo central 189 (vide figura 6). Conforme será entendido por aqueles versados na citometria de fluxo, a focalização hidrodinâmica e de fluxo laminar do núcleo central 189 tende a confinar as partículas ao núcleo 189, com pouca mistura do revestimento 19 e fluido catalisador 17 no bocal 137. Adicionalmente, o núcleo central 189 permanece essencialmente intacto dentro do revestimento 191 à

medida que o fluxo 21 se move através do sistema de bocal 101, até o momento em que as gotículas 33 são formadas na localização de ruptura 107. Este tipo de fluxo coaxial é particularmente adequado para a citometria de fluxo, porque as partículas a serem analisadas são confinadas dentro do núcleo relativamente estreito 189 do fluxo. Como resultado, um feixe de luz 25 focalizado no centro ou núcleo 189 do fluxo 21 irá iluminar as partículas, de modo que elas possam ser analisadas substancialmente uma de cada vez. Com o confinamento do núcleo 189 dentro de um diâmetro suficientemente estreito, pode-se obter uma iluminação mais uniforme das partículas no fluido do núcleo 189. Para bons resultados analíticos, o diâmetro do núcleo contendo as partículas deve estar desejavelmente dentro de uma faixa de 7 a 20 microns, e, mais desejavelmente, dentro de uma faixa de 7 a 14 microns. O diâmetro do fluxo de núcleo 189 pode ser aumentado ou diminuído com o ajuste da taxa de distribuição de fluido de revestimento 17 com relação à taxa de distribuição do fluido de revestimento 19.

ORIENTAÇÃO DA CÉLULA

[00163] Para otimizar os resultados analíticos, é desejável que partículas apresentando formas assimétricas estejam em uma orientação desejada quando de sua passagem através do feixe de luz proveniente do sistema óptico. Como é conhecido daqueles versados na técnica, as emissões de fluorescência originárias de partículas assimétricas tendem a ser anisotrópicas (isto é, a intensidade das emissões não é uniforme em todas as direções). Conforme usado aqui, o termo "orientação desejada" indica uma orientação que permite que o sistema de processamento discrimine entre as células apresentando diferentes características com uma precisão em uma faixa de 70% a 100%, mais desejavelmente, em uma faixa de 80% a 100%, ainda mais desejavelmente em uma faixa de 90% a 100%, e, mais desejavelmente ainda de 95% ou mais.

[00164] Para ilustrar o ponto, uma célula de esperma bovino 201 é ilustrada nas figuras 6 e 7. Tipicamente, a célula apresenta uma cabeça na forma de espátula 205 com faces opostas largas relativamente achatadas 207 e bordas estreitas 209, um núcleo 213 na cabeça 205 contendo a massa de DNA cromática da célula, e uma cauda 215 que se estende da cabeça 205 provendo a motilidade necessária para a fertilização eficaz. A célula de esperma bovino média 201 apresenta um comprimento de cabeça 219 de cerca de 8 μm , uma largura de cabeça 221 de cerca de 4 μm , e um comprimento total 223 da frente da cabeça para a extremidade da cauda de cerca de 100 μm . Na célula de esperma bovino média 201, o núcleo 213 ocupa a maior parte do volume da cabeça e é apenas ligeiramente menor que a cabeça do esperma 205. Desse modo, o comprimento do núcleo 217 é quase igual ao comprimento da cabeça 219, novamente sendo de cerca de 8 μm no comprimento. Foi observado que no bovino, os cromossomos X/Y das células de esperma 201 são localizados em uma região do núcleo 225 (figura 6) abaixo e imediatamente adjacente à linha intermediária longitudinal ou equador 211 ou centro da cabeça 205. Mais especificamente, esta região subequatorial 225 se estende não mais de cerca de 20% do comprimento do núcleo 217 na metade inferior (na direção da cauda 215) do núcleo 213, ainda mais especificamente não mais de cerca de 10-15% do comprimento do núcleo 217 na metade inferior do núcleo 213, e ainda mais especificamente não mais de cerca de 1,0-1,5 μm abaixo do equador 211 do núcleo 213.

[00165] Quando as células de esperma passarem através do feixe de excitação 25, será desejável que as células de esperma estejam substancialmente em uma única fila e que a cabeça 205 de cada célula 201 seja substancialmente orientada para reduzir a variabilidade de orientação de célula para célula e assim prover uma medição mais uniforme das células. Também é desejado que as células apresentem

uma orientação que permita a discriminação precisa entre as células X e Y. Desejavelmente, esta orientação se dá onde o comprimento da célula de esperma 201 é geralmente alinhado com a direção do fluxo de fluido 227 (seja a dianteira da cabeça (mostrado na figura 6), seja a traseira da cabeça) e onde a cabeça 205 da célula de esperma 201 é girada em seu eixo longitudinal, de modo que a cabeça 205 fique dentro de um invólucro angular 229, no qual o feixe de laser 25 originário do sistema óptico 109 atinge uma face larga 207 da célula 201 geralmente no sentido da largura, conforme mostrado esquematicamente na figura 7, em vez de uma borda estreita 209 da célula. Preferivelmente, o invólucro 229 que define a orientação desejada é gerado pela rotação de uma célula de esperma 201 através de uma faixa angular de R1 com relação a um plano P que é geralmente perpendicular ao feixe de luz entrante 25, conforme visto em uma seção transversal tomada transversalmente através do fluxo 21. A faixa R1 é preferivelmente de 0 a 90 graus, mais preferivelmente de 0 a 60 graus, e ainda mais preferivelmente de 0 a 30 graus. O bocal da presente invenção é configurado para conseguir esta orientação desejada com uma precisão de até 90% ou mais.

[00166] A tolerância para orientação de esperma (isto é, o tamanho do invólucro 229 definido pela faixa angular R1) é relacionada à abertura numérica da lente usada para coletar emissões de fluorescência 31 das células de esperma. Na concretização mostrada na figura 7, por exemplo, o sistema óptico 109 apresenta um volume de detecção 579 de emissão de fluorescência 31 definido por um ângulo sólido de 55 graus. Quando a orientação rotacional de uma cabeça de esperma 205 estiver fora do invólucro 229 definido por R1 à medida que o esperma se move através do feixe 25, uma emissão de fluorescência relativamente mais resistente 31 proveniente de uma borda 209 da cabeça do esperma 205 será coletada pelo sistema óptico 109, impedin-

do que o processador 131 correlacione a intensidade da emissão de fluorescência 31 com o teor de cromossomo X/Y da célula de esperma 201. Entretanto, o sistema óptico 109 não coleta as emissões de fluorescência relativamente resistentes 31 da borda estreita 209 das cabeças do esperma 205, já que a orientação rotacional de uma cabeça de esperma 205 está dentro do invólucro 229, à medida que ela passa através da localização de interrogação 115. Desse modo, na concretização mostrada na figura 7, a orientação da célula de esperma não resulta na coleta de emissões de fluorescência lateralmente relativamente mais resistentes, já que as bordas estreitas 209 da cabeça de esperma 205 são confinadas dentro do ângulo R1. O ângulo sólido do volume de coleta 579 pode ser diminuído com o uso de uma lente com uma abertura numérica menor, aumentando assim o ângulo R1 e a tolerância para esperma pobremente orientado. Entretanto, isto também diminui o número de fótons que pode ser coletado pelo sistema óptico 109, o que atinge a medição das emissões de fluorescência 31 com a redução da intensidade das emissões 31 detectadas pelo fotodetector. Igualmente, se o sistema óptico 109 coletar as emissões de fluorescência 31 com uma lente de abertura numérica elevada para se obter uma intensidade mais resistente das emissões de fluorescência detectadas pelo fotodetector, então, a tolerância para a orientação do esperma diminuirá. Assim, no projeto de um sistema da presente invenção, é necessário atingir o equilíbrio entre a tolerância para a orientação do esperma e a abertura de lente numérica. O ótimo equilíbrio irá depender das capacidades de orientação e da sensibilidade óptica do sistema. Em uma concretização desejável, por exemplo, é usada uma lente apresentando uma abertura numérica 0,65.

PROJETO DO BOCAL

[00167] Em uma concretização, conforme mostrado nas figuras 8 e 9, o interior 231 do corpo de bocal 139 a jusante do contrafuro 145

apresenta uma superfície interna 233 que compreende uma primeira, uma segunda e uma terceira região axialmente afuniladas 235, 237, 239 para progressivamente acelerar a velocidade do fluxo de fluido 21 em uma direção a jusante na direção do bocal 103. Conforme indicado anteriormente, esta aceleração funciona para espaçar as partículas (por exemplo, células) no fluxo 21, de modo que elas assumam uma formação em fila geralmente única para que elas possam ser analisadas substancialmente uma partícula de cada vez. Pelo menos duas destas regiões, e, preferivelmente todas as três 235, 237, 239, apresentam formas geralmente elípticas em seções transversais tomadas em ângulos retos ao eixo longitudinal 247 do bocal 137, conforme é mostrado nas figuras 9A-9H e figuras 9J-9K. A superfície interna 233 do corpo de bocal 139 apresenta também uma quarta região 249, não-afunilada, a jusante das três primeiras regiões 235, 237, 239 e imediatamente a montante do orifício de bocal 103 que, em uma concretização, é formada em um membro de orifício separado 255 preso em um contrafuro 257 na frente do corpo de bocal 139. Em uma concretização, as formas em seção transversal geralmente elípticas das primeira e segunda regiões 235 e 237 são orientadas substancialmente na mesma direção para definir uma primeira zona torsional 259, e a forma em seção transversal geralmente elíptica da terceira região 239, constituindo uma segunda zona torsional 261, é orientada em um ângulo (por exemplo, de cerca de 90 graus) com relação às formas de seção transversal elípticas das primeira e segunda regiões 237. A orientação é tal que a superfície interna 233 do corpo de bocal 139 aplica forças torsionais ao fluxo de fluido 21 e assim tende a orientar as células de esperma 201 na orientação desejada acima mencionada, à medida que elas passam através do orifício de bocal 104. Preferivelmente, a primeira zona torsional 259 apresenta um comprimento axial 273 de 3,0-4,5 mm, preferivelmente de cerca de 3,6 mm, e as primeira e se-

gunda regiões afuniladas 235 e 237 que formam a zona 259 apresentam comprimentos axiais aproximadamente iguais 275, 277 (por exemplo, de cerca de 1,8 mm). A segunda zona torsional 261 apresenta um comprimento axial 279 de 3,5-5,0 mm, preferivelmente de cerca de 4,45 mm. A quarta região 249 preferivelmente apresenta uma forma geralmente cilíndrica. Cada forma elíptica geralmente em seção transversal A-D (figura 8) nos limites das primeira, segunda e terceira regiões 235, 237 e 239 apresenta um diâmetro de eixo principal e um diâmetro de eixo secundário, dimensões exemplificativas das quais são mostradas na figura 8 e na Tabela 1 abaixo.

TABELA 1

Elipse	Diâmetro do eixo principal (mm)	Diâmetro do eixo secundário (mm)	Proporção
A	7,0	6,0	1,2
B	6,1	5,3	1,15
C	2,1	2,1	1
D	0,9	0,2	1,45

[00168] Será entendido que as dimensões acima são exemplificativas, e que outras dimensões e formas podem também ser adequadas. Funcionalmente, as mudanças nas proporções entre os diâmetros principal e secundário, e as orientações diferentes das formas elípticas das regiões, criam forças laterais que atuam sobre cada célula 201 e aplicam uma força torsional 271 que tende a girar a célula 201 em seu eixo longitudinal, de modo que suas faces largas 207 se alinhem com o eixo secundário na primeira zona torsional 259 e à medida que a célula é suavemente torcida (por exemplo, 90 graus) para alinhar com o eixo secundário da segunda zona torsional 261. Cada das superfícies afuniladas 235, 237, 239 serve também para acelerar o fluxo 21 (e células) que fluem através do bocal 101. Em uma concretização, a aceleração aumenta mais gradualmente nas primeira e terceira regiões 235 e 239 e mais rapidamente na segunda região 237. Novamente, por

meio de exemplo, o afunilamento da primeira região 235 pode variar de cerca de 11-14 graus; o afunilamento na segunda região 237 pode variar de cerca de 42-48 graus; e o afunilamento na terceira região 239 poder variar de cerca de 8-12 graus. O corpo de bocal 139 é formado de um material adequado, tal como plástico moldado (ABS) ou metal.

[00169] O membro de orifício 255 (figura 8) é preferivelmente formado de um material duro resistente ao desgaste, tal como safira, que é capaz de ser trabalhado à máquina ou, de outro modo, formado com dimensões precisas. O membro de orifício 255 apresenta, em uma primeira concretização, uma superfície cônica a montante 309 de seção transversal geralmente circular que diminui no diâmetro de cerca de 0,92 mm a cerca de 0,60 mm e apresenta um comprimento axial 317 de cerca de 0,54 mm e um ângulo de afunilamento de cerca de 39 graus. O membro de orifício 255 também apresenta uma superfície a jusante geralmente cilíndrica 315 com uma câmara de cerca de 0,060 mm e um comprimento axial 325 de cerca de 0,36 mm. Estas dimensões são exemplificativas apenas, e será entendido que o membro de orifício 255 pode ter outros tamanhos e formas. Por exemplo, a forma da superfície a montante 309 pode ser geralmente elíptica (oval) na seção transversal, e o diâmetro do orifício 103 na extremidade a jusante do bocal 137 pode variar de 40 a 100 microns ou mais. É desejável que o tamanho do orifício 103 seja tal que as células que saem do bocal 101 se apresentem substancialmente em formação de fila única dentro do núcleo 189 do fluxo 21 e substancialmente na orientação desejada, conforme descrito anteriormente. Por exemplo, no caso de células de esperma, um orifício 103 apresentando um diâmetro de cerca de 60-62 microns na extremidade a jusante foi considerado como sendo adequado. Preferivelmente, o orifício de bocal 103 serve para adicionalmente acelerar o fluxo 21 e para formar e dimensionar o fluxo 21 para um ótimo espaçamento de célula, orientação de célula e for-

mação de gotículas 33, conforme será descrito.

[00170] A velocidade das células à medida que elas saem do bocal 137 irá depender de diversos fatores, incluindo a pressão na qual o fluido de revestimento 19 é introduzido no sistema de bocal 101. Em uma pressão de 137,5 kPa (20 psi), as células sairão do orifício de bocal 103 da concretização acima em uma velocidade de cerca de 16,6 m/s como um fluxo geralmente cilíndrico 21 contendo células que são substancialmente orientadas de modo similar no núcleo 189 do fluxo 21. Em uma pressão de revestimento de 206,25 kPa (30 psi), a velocidade da célula será de cerca de 20,3 m/s. Em diferentes pressões do fluido de revestimento 19, a velocidade do fluxo 21 irá variar.

INTRODUÇÃO DO FLUXO DE NÚCLEO NA ZONA TORSIONAL

[00171] A orientação aperfeiçoada de partículas pode ser obtida com a alteração do escoamento do fluxo de fluido 21 através de um bocal de orientação, de modo que o fluxo de núcleo 189 contendo as partículas a serem orientadas (por exemplo, células de esperma) seja direcionado ao longo de um percurso de fluxo, pelo menos uma porção do qual é deslocada do centro do bocal, de modo que as partículas sejam submetidas a forças de orientação hidrodinâmicas geradas por um bocal enquanto elas estão em uma localização que é deslocada do centro do bocal. O direcionamento do fluxo de núcleo 189 ao longo de um percurso de fluxo de deslocamento pode também aperfeiçoar a orientação de partículas em um bocal tradicional (isto é, aquele que não dispões de quaisquer zonas torsionais). Em muitos bocais, pode-se determinar que uma determinada posição seja deslocada do centro do bocal porque ela está deslocada de um eixo longitudinal do bocal. Pode-se também reconhecer que uma posição específica seja deslocada do centro de um bocal porque ela está deslocada do centro geométrico de uma área em seção transversal do bocal através da qual o fluxo de fluido flui.

[00172] Inúmeras técnicas podem ser usadas para direcionar o fluxo de núcleo 189 ao longo de um percurso de fluxo que seja deslocado do centro do bocal. Por exemplo, um defletor de orientação pode ser posicionado no bocal para defletir o fluxo de núcleo para um lado do bocal. Similarmente, o conduto 157 para introdução do fluxo de núcleo 189 contendo as partículas de amostra pode ser relocado do centro tradicional do bocal para uma localização deslocada. Adicionalmente, é contemplado que um conduto de introdução de amostra em localização deslocada 157 possa ser usado em combinação com um defletor de orientação. Concretizações exemplificativas de uso de um defletor de orientação e uso de um conduto de introdução de amostra em localização deslocada são discutidas abaixo.

[00173] A orientação aperfeiçoada de partículas (por exemplo, células de espermatozoides) conseguida pelo uso de um defletor de orientação e/ou conduto de introdução de amostra em localização deslocada 157 pode se dar devido a inúmeros fatores. Um fator é o de que a deflexão do fluxo de núcleo 189 e/ou uma mudança no tamanho e na forma da área de fluxo em seção transversal resulta na aplicação de forças hidrodinâmicas que tendem a orientar partículas assimétricas. (Kachel e outros *Histochemistry and Cytochemistry*, 25(7): 774-80 (1977)). Outro fator é aquele em que foi considerado que as partículas assimétricas (em particular, células de espermatozoides) tendem a se orientar à medida que elas fluem um fluxo de fluido nas proximidades de uma superfície sólida. Desse modo, com o direcionamento do fluxo de núcleo 189, de modo que ele fique nas proximidades da superfície interna de um bocal ou uma superfície de defletor, pode-se obter uma orientação aperfeiçoada das partículas. Adicionalmente, um defletor e/ou conduto de introdução de amostra em localização deslocada podem ser usados em conjunção com um bocal de orientação que aplica forças de orientação adicionais (por exemplo, forças torsionais) às partículas assimé-

tricas. Nesse caso, o defletor pode operar para direcionar o fluxo de fluido, de modo que o fluxo de núcleo contendo as partículas a serem orientadas flua ao longo de um percurso que é deslocado do centro do bocal enquanto as partículas são submetidas às forças torsionais geradas por uma ou mais das zonas torsionais.

DEFLETOR DE ORIENTAÇÃO

[00174] As figuras 10-13 mostram um defletor de orientação exemplificativo, geralmente indicado por 2001, posicionado no bocal de orientação 137 descrito acima. Entretanto, o defletor 2001 poderia ser usado em conjunção com um bocal diferente, incluindo um bocal de não-orientação, sem se afastar do escopo desta invenção. O defletor 2001 é posicionado no bocal a montante do orifício 103 e a jusante da agulha de injeção de amostra 157. Com referência às figuras 14 e 15, o defletor compreende uma placa defletora 2003 que é mantida no lugar por um suporte de defletor 2005. Na concretização mostrada, a placa defletora 2003 apresenta geralmente a forma de L e construída de um material substancialmente rígido, durável e resistente à corrosão (por exemplo, aço inoxidável). A placa na forma de L 2003 apresenta uma perna a montante 2007 e uma perna a jusante 2009 que são desejavelmente substancialmente perpendiculares entre si (por exemplo, dentro de cerca de 5 graus). Na concretização exemplificativa mostrada nos desenhos, as duas pernas 2007, 2009 da placa na forma de L 2003 se intersectam em uma linha 2015 que é perpendicular ao eixo longitudinal 2017 do bocal 137 (figura 11). Conforme mostrado na figura 14, a linha de interseção 2015 é também espaçada a uma curta distância 2033 (por exemplo, cerca de 0,3 mm) longe do eixo longitudinal 2057 do suporte de defletor 2005. A perna a montante 2007 da placa na forma de L 2003 estende-se da linha de interseção 2015 longe do eixo longitudinal 2017 do bocal 137 por todo o caminho para a borda do suporte de defletor 2005, conforme mostrado na figura

15. Assim, a perna a montante 2007 é formada com uma borda curva-da 2019 que se casa estritamente com a forma do suporte de defletor 2005. Conforme mostrado na figura 14, a perna a montante 2007 é inclinada em um ângulo AA de cerca de 15-25 graus da perpendicular para o eixo longitudinal 2057 do suporte de defletor 2005. A perna a jusante 2009 da placa na forma de L 2007 se estende a jusante a partir da linha de interseção 2015 das duas pernas 2007, 2009 a uma distância 2025 de cerca de 2,0-2,5 mm em um ângulo BB que está na faixa de cerca de 60-80 graus da perpendicular para o eixo longitudinal 2057 do suporte de defletor 2005.

[00175] O suporte de defletor 2005 é dimensionado e formado para se ajustar dentro do bocal 137, conforme mostrado nas figuras 10-13. O suporte de defletor 2005 é preferivelmente feito de um material moldável (por exemplo, polipropileno), embora o suporte de defletor 2005 possa ser construído de outros materiais sem se afastar do escopo da presente invenção. O suporte de defletor 2005 usado na concretização exemplificativa, mostrado nas figuras 14 e 15, é geralmente formado como um invólucro cilíndrico oco de cerca de 4,0-4,5 mm no comprimento total 2027. O suporte de defletor 2005 apresenta um diâmetro externo 2029 de cerca de 5-6 mm e um diâmetro interno 2031 de cerca de 2,5-3,5 mm. Se o suporte de defletor 2005 for moldado, uma tração menor (não-mostrada) poderá ser provida sobre as superfícies do suporte 2005 (por exemplo, para permitir que o suporte de defletor seja facilmente removido de uma máquina de moldagem por injeção). A extremidade a montante 2035 do suporte de defletor exemplificativo 2005 apresenta uma superfície inclinada 2037 que é inclinada no mesmo ângulo AA que a perna a montante 2007 da placa na forma de L 2003. A perna a montante 2007 da placa na forma de L 2003 se apóia contra a superfície inclinada 2037 do suporte de defletor 2005 e é sustentada por esta. As bordas laterais 2039 (figura 15) da perna a

jusante 2009 da placa na forma de L 2003 são parcialmente embutidas (por exemplo, recebidas em fendas) no suporte de defletor 2005 para deter a placa defletora 2003 em uma posição na qual a perna a jusante 2009 se estende geralmente de um lado do suporte de defletor 2005 para o outro. A borda a jusante 2041 da perna a jusante 2009 na concretização exemplificativa forma uma linha reta que é geralmente perpendicular ao eixo longitudinal 2057 do suporte de defletor 2057. Há um vão 2049 (figura 14) entre a borda a jusante 2041 da perna a jusante 2009 e a superfície cilíndrica interna 2051 do suporte de defletor 2005. O vão 2049 propicia a comunicação de fluido entre um volume 2053 definido pelas pernas 2007, 2009 da placa na forma de L 2003 e a superfície cilíndrica interna 2051 do suporte de defletor 2003 e o resto do volume interno 2055 do bocal 137.

[00176] O suporte de defletor 2005 é desejavelmente posicionado dentro do bocal com o eixo longitudinal 2057 no suporte de defletor 2005 geralmente alinhado com o eixo longitudinal 2017 do bocal 137, de modo que ele detenha a placa na forma de L 2003 na posição descrita acima. Desejavelmente, a placa defletora exemplificativa 2003 é giratoriamente orientada de modo que a linha de interseção 2015 das duas pernas 2007, 2009 da placa 2003 seja paralela a uma linha 2059 que corre através do eixo principal da elipse D, conforme mostrado na figura 16. Entretanto, o defletor exemplificativo 2001 também apresenta uma boa execução quando a interseção 2015 das duas pernas 2007, 2009 da placa na forma de L 2003 for perpendicular à linha 2059 que corre através do eixo principal do elipse D, conforme mostrado na figura 17. Adicionalmente, o defletor pode ter qualquer orientação rotacional sem se afastar do escopo desta invenção. Conforme mostrado na figura 12, a agulha de injeção de amostra 157, na concretização exemplificativa, está desejavelmente a uma distância 2061 de cerca de 0,25 - 1,0 m a montante da porção mais a montante 2035 do defletor

2001. Mais desejavelmente, a agulha de injeção de amostra 157 está acerca de 0,55 - 0,65 a montante da porção mais a montante 2035 do defletor 2001.

[00177] O suporte de defletor 2005 pode ser mantido em uma posição desejada com relação ao bocal em uma infinidade de maneiras. Com referência à figura 14, a extremidade a jusante 2067 do suporte de defletor 2005 é escalonada de modo que ela se ajuste mais afastadamente a jusante no bocal 137. A extremidade escalonada a jusante 2067 do suporte 2005 tem forma circular e se apóia contra a superfície interna elípticamente formada 233 do bocal 137. Assim, o contato entre a superfície interna 233 do bocal 137 e o suporte de defletor 2005 é geralmente limitado a dois pontos 2069, conforme mostrado na figura 13. Um par de anéis em O 2071 é posicionado em torno do suporte de defletor 2005 entre o bocal 137 e a projeção rosqueada 149 do corpo de fluxo 133 (figuras 11-13) e vedam o sistema de bocal 101 contra vazamento. Os anéis em O 2071 podem ser feitos de Viton®, ou quaisquer outros materiais similares. Os dois anéis em O 2071 são comprimidos à medida que o bocal 137 é atarraxado na projeção rosqueada 149 para prover uma vedação estanque ao fluido. Dois anéis em O 2071 são usados na concretização exemplificativa porque um único anel em O não pode ser comprimido dentro do espaço entre o bocal 137 e o corpo de fluido 133 devido ao comprimento 2027 do suporte 2005. Qualquer número de anéis em O ou um diferente tipo de vedação poderia ser usado sem se afastar do escopo da presente invenção, uma vez que o número de anéis em O ou outro tipo de vedação é selecionado, de modo que haja uma vedação estanque ao fluido quando o bocal 137 for atarraxado no corpo de fluido 133. Isto irá depender de inúmeros fatores, incluindo o tamanho e a forma do bocal 137, o corpo de fluido 133, o suporte de defletor 2005, os anéis em O 2071, bem como o tipo de vedação. Os anéis em O 2071 tambémaju-

dam o suporte de defletor 2005 na posição desejada. Os anéis em O 2071 ocupam o espaço em torno do suporte de defletor 2005, restringindo assim o movimento de lado a lado do suporte de defletor 2005 dentro do bocal 137. Forças de atrito entre os anéis em O 2071 e o suporte de defletor 2005 também resistem ao movimento rotacional do suporte de defletor.

[00178] Quando o bocal 137 for estancado no corpo de fluxo 133, conforme mostrado na figura 12, a extremidade a jusante 2077 da projeção rosqueada 149 a partir do corpo de fluxo 133, na forma de uma saliência, nesta concretização, ficará aproximadamente nivelada com a porção mais a montante 2035 do defletor 2001. Como resultado, o suporte de defletor 2005 é mantido axialmente cativo entre o corpo de fluxo 133 (na extremidade a montante 2035 do suporte de defletor 2005) e a superfície interna 233 do bocal 137 (na extremidade a jusante 2067 do suporte de defletor 2005). Outros mecanismos de retenção podem ser usados. Na concretização mostrada nos desenhos, o diâmetro interno da saliência 2079 (figura 12) na extremidade a jusante da projeção rosqueada 149 é aproximadamente igual ao diâmetro interno 2031 do suporte de defletor 2005.

[00179] Aqueles versados na técnica irão reconhecer que o fluxo através do sistema de bocal 101 permanece laminar apesar do defletor 2001 porque a área em seção transversal pequena através da qual os fluidos têm que fluir resulta em um número Reynolds inferior para o fluxo. Como é mostrado na figura 11, o defletor deflete o fluxo de núcleo 189 e o fluxo de revestimento 191 longe do eixo longitudinal central 2017 do bocal 137 e na direção da superfície interna 233 do bocal 137. Em uma concretização, o fluxo de núcleo 189 também flui muito próximo à superfície interna 233 do bocal 137, à medida que o fluxo de núcleo 189 passa entre a transição entre a primeira e a segunda zona torsionais 259 e 261. Contudo, uma porção 2081 do fluxo de fluido de

revestimento 191 permanece entre o fluxo de núcleo 189 e a superfície interna 233 do bocal 137, de modo que as partículas no fluxo de núcleo 189 de fato não atinjam ou entrem em contato com a superfície interna 233 do bocal 137. Mais a jusante no bocal 137, as forças hidrodinâmicas empurram o fluxo de núcleo 189 de volta para o centro do bocal 137 (por exemplo, em alinhamento com o eixo longitudinal 2017 do bocal 137).

[00180] Com referência às figuras 18A-18E, o defletor 2001 muda a forma e reduz o tamanho da área de fluxo em seção transversal no bocal 137. (Para fins de clareza, as figuras 18A-18E não mostram qualquer estrutura de bocal a jusante do defletor. A área de fluxo em cada uma das figuras 18A-18E é delineada em negrito para fins de clareza.) A montante do defletor 2001 (figura 18A), a área de fluxo em seção transversal 2087 é geralmente circular ou elíptica. Na extremidade a montante 2035 do defletor 2001, a área de fluxo começa a mudar de uma forma circular para uma forma geralmente semicircular 2089 na interseção 2015 das pernas 2007, 2009 da placa defletora 2003 (figura 18B), embora outras formas possam ser adequadas. Aí, a área de fluxo em seção transversal 2089 é menor que a área de fluxo 2087 a montante do defletor. A figura 18C ilustra a área de fluxo 2091 à medida que o fluxo flui através de uma parte do suporte de defletor 2005, e a figura 18D ilustra a área de fluxo 2093 mais a jusante na extremidade a jusante 2041 da perna a jusante 2009 da placa defletora 2003. Será observado que a área de fluxo 2093 é um tanto maior que a área de fluxo 2091 devido à orientação angular da perna a jusante 2009 da placa defletora 2003. A jusante da placa defletora 2003 (figura 18E), a área de fluxo 2094 através do defletor corresponde à forma da superfície interna 2051 do suporte de defletor 2005, que é circular na concretização ilustrada. (Outras formas podem ser adequadas.) A jusante do suporte de defletor 2005, as zonas torsionais 259, 261 do bo-

cal 137 desejavelmente conferem forças torsionais, conforme discutido acima.

[00181] Conforme mostrado na figura 11, foi observado que uma ou mais bolhas de ar 2095 podem ficar aprisionadas no volume 2053 entre a perna a jusante 2009 da placa na forma de L 2003 e o suporte de defletor 2005. Adicionalmente, uma porção de uma bolha 2095 pode se estender através do vão 2049 entre a borda 2041 da perna a jusante 2009 e o suporte de defletor 2005. Assim, a(s) bolha(s) de ar 2095 pode(m) ocupar uma porção da área de fluxo em seção transversal a jusante da perna a jusante 2009 da placa na forma de L 2003, afetando talvez o fluxo de fluido através do bocal 137. O defletor exemplificativo 2001 foi considerado como trabalhando bem, tanto com como sem a(s) bolha(s) de ar 2095. Desse modo, um defletor pode ser usado para orientar as células de esperma sem o envolvimento de quaisquer bolhas sem se afastar do escopo da presente invenção.

[00182] Outro defletor de orientação exemplificativo, geralmente indicado por 2097, é mostrado nas figuras 19 e 20. O defletor 2097 compreende uma placa defletora chata geralmente semicircular 2099 no bocal de orientação 137 discutido acima. A placa defletora 2099 é posicionada no bocal 137 a jusante do conduto de introdução de amostra 157 e geralmente perpendicular ao eixo longitudinal 2017 do bocal 137. A placa defletora 2099 apresenta uma borda curvada 201 que geralmente se casa com a curvatura da superfície interna 233 do bocal 137, de modo que não haja quaisquer vãos entre a borda curvada 2101 da placa defletora 2099 e a superfície interna 233 do bocal 137. A placa defletora 2099 também apresenta uma borda reta 2103 que se estende a uma curta distância além do eixo longitudinal 2017 do bocal 137, de modo que ela fique aproximadamente alinhada com o diâmetro externo 2109 do conduto de introdução de amostra 157. A placa defletora 2099 é mantida em posição pelo atrito resultante da

compressão da placa defletora 2099 entre uma vedação de anel em O 2105, que é similar às vedações de anel em O 2071 descritas em conexão com o defletor na forma de L 2001 acima, e um projeção anular ou saliência 2107 formada no interior do bocal 137. Conforme mostrado na figura 19, o defletor de orientação 2099 opera por meio da deflexão do fluxo de fluido, de modo que o fluxo de núcleo 189 contendo as partículas a serem analisadas seja deslocado do eixo longitudinal central 2017 do bocal 137 ao longo de uma porção de seu percurso de fluxo. Por exemplo, o fluxo de núcleo 189 pode ser dirigido a longo de um percurso de fluxo que é deslocado do eixo longitudinal 2017 do bocal 137 à medida que ele flui através da primeira zona torsional 259, bem como pelo menos uma porção da segunda zona torsional 261. Conseqüentemente, as partículas (por exemplo, células de espermatozoides) são submetidas às forças torsionais geradas pelas zonas torsionais 259, 261 enquanto elas estão em uma posição que é deslocada do eixo longitudinal central 2017 do bocal 137.

[00183] Aqueles versado na técnica irão reconhecer que mudanças substanciais podem ser feitas sem se afastar dos defletores exemplificativas 2201, 2097 descritas acima sem se afastar do escopo da presente invenção. Tudo o que é exigido é que o defletor seja configurado para defletir o fluxo de núcleo 189 e o fluido de revestimento 191 na direção de uma superfície interna do bocal para fazer com que o núcleo 189 e o fluido de revestimento 191 fluam através de uma área em seção transversal que muda no tamanho e/ou na forma. Adicionalmente, é entendido que a estrutura de defletor de orientação pode ser integralmente formada com o bocal, ou integralmente formada com o bocal e corpo de fluxo sem se afastar do escopo da presente invenção.

CONDUTO DE INTRODUÇÃO DE AMOSTRA EM LOCALIZAÇÃO DESLOCADA

[00184] O fluxo de núcleo 189 pode ser direcionado ao longo de um

percurso de fluxo que é deslocado do eixo longitudinal central 2017 do bocal 137 com o reposicionamento do conduto de introdução de amostra 157 de sua posição tradicional no centro do bocal 137 para uma posição deslocada. Por exemplo, a figura 21 mostra um sistema exemplificativo de bocal de introdução de amostra em localização deslocada 2151 que apresenta um conduto de introdução de amostra em localização deslocada 157. Exceto conforme notado, o sistema de bocal 2151 é substancialmente igual ao sistema de bocal 101 mostrado nas figuras 4 e 5. A diferença significativa é a de que o conduto de introdução de amostra 157 foi movido longe do centro do bocal 137, de modo que ele não fique mais alinhado com o eixo longitudinal do bocal 2017. Assim, o fluxo de núcleo 189 é direcionado para as zonas torsionais 259, 261 do bocal de orientação 137 ao longo de um percurso de fluxo que é deslocado do eixo longitudinal 2017. Embora o sistema de bocal exemplificativo 2151 mostrado na figura 21 use o bocal de orientação exemplificativo 137 descrito acima, é contemplado que o conduto de introdução de amostra em localização deslocada 157 pudesse ser usado com um bocal de orientação diferente ou um bocal de não-orientação para orientar partículas no fluxo de núcleo 189.

MONTAGEM E AJUSTE DE BOCAL

[00185] O corpo de fluxo 133 e o bocal 137 são montados em uma posição e orientação selecionadas por meio de um suporte de bocal, geralmente indicado por 331. Em uma concretização (figura 22), o suporte 331 compreende uma pluralidade de estrados, incluindo um primeiro e um segundo estrado lineares 333, 337 provendo o ajuste linear do corpo de fluxo 133 e do bocal 137 ao longo dos eixos X e Y 339. 341, respectivamente, e um terceiro estrado rotacional 343 provendo o ajuste rotacional em torno de um eixo Z 345 correspondendo ao eixo longitudinal 2017 do corpo de fluxo 133 e do bocal 137. Estes estrados 333, 337, 343 podem ser convencionais no projeto, estrados adequa-

dos sendo comercialmente disponíveis, por exemplo, pela Newport Corporation of Irvine CA. Em particular, o primeiro estrado de movimento linear 333 compreende um primeiro membro de estrado fixo (não-mostrado) montado em uma armação 349, um primeiro membro de estrado móvel 355 deslizável no primeiro membro de estrado fixo ao longo do eixo X 339, e um atuador 357, por exemplo, um micrômetro, para mover com precisão o primeiro membro de estrado móvel 355 para uma posição de eixo X selecionada. O segundo estrado de movimento linear 337 compreende um segundo membro de estrado fixo 359 montado em um primeiro membro de estrado móvel 355, um segundo membro de estrado móvel 361 deslizável no segundo membro de estrado fixo 359 ao longo do eixo Y 341, e um atuador 363, por exemplo, um micrômetro, para mover com precisão o segundo membro de estrado móvel 361 para uma posição de eixo Y selecionada. O estrado rotacional (terceiro) 343 compreende um terceiro membro de estrado fixo 365 montado no segundo membro de estrado móvel 316, um terceiro membro de estrado móvel 371 giratoriamente montado no terceiro membro de estrado 365 para rotação em torno do eixo Z 345, e um atuador 373, por exemplo, um micrômetro, para girar com precisão o terceiro membro de estrado móvel 371 para uma posição angular selecionada com relação ao eixo Z 345. O ajuste de três eixos provido por estes estrados 333, 337, 343 permite que o bocal 137 e o fluxo de fluido 21 que sai do orifício do bocal 103 sejam posicionados com precisão com relação ao sistema óptico 109. A rotação do bocal 137 em torno do eixo Z 345 é particularmente útil porque ela permite que o fluxo 21 que sai do bocal 137 seja girado para trazer as células (por exemplo, a células de esperma) orientadas pelo bocal 137 para uma posição na qual o feixe de luz 25 originário do sistema óptico 109 venha a cair sobre as superfícies desejadas das células (por exemplo, as faces achatadas 207 das cabeças de esperma 205), conforme ilus-

trado esquematicamente na figura 23. Outros suportes de bocal podem ser adequados. Por exemplo, um sistema de montagem de bocal de quatro eixos pode também ser usado, provendo o ajuste linear ao longo dos eixos X, Y e Z e o ajuste rotacional ao longo do eixo Z. Adicionalmente, pode ser desejável usar um ou mais estrados apresentando uma característica de alinhamento automatizado, tal como um estrado de microtranslação controlado por servomotor ou motor escalonador (por exemplo, número da peça M-110.2DG da Polytech PI, Inc. of Auburn, Michigan).

[00186] Em uma concretização mostrada esquematicamente na figura 36, por exemplo, o bocal 137 é orientado para direcionar um fluxo 21 contendo células a serem analisadas em uma direção geralmente ascendente. O ângulo 377 entre a direção do fluxo de fluido 21 e a horizontal está preferivelmente na faixa de 5 a 85 graus, mais preferivelmente na faixa de 15 a 75 graus, ainda mais preferivelmente de cerca de 30 a 65 graus, ainda mais preferivelmente de cerca de 45 a 60 graus, e mais preferivelmente de cerca de 50 a 55 graus. Esta orientação é vantajosa pelo fato de qualquer ar aprisionado no sistema de bocal 101 ser prontamente removido. Também, a velocidade do fluxo de fluido 21 diminui gradualmente de acordo com a força de gravidade antes da coleta das gotículas 33. Acredita-se que uma desaceleração mais gradual das gotículas 33 seja menos estressante para as células a serem analisadas, o que, no caso de células de espermatozoides, pode resultar em uma maior motilidade do espermatozoide separado depois da coleta. Naturalmente, em outras concretizações da presente invenção, o bocal 101 é posicionado de modo que o fluxo de fluido 21 apresente uma velocidade substancialmente descendente, quando ele sair do orifício 103, como é convencional para citômetros de jato no ar.

[00187] Opcionalmente, os componentes do sistema de bocal 101, tal como o corpo de fluxo 133 e o bocal 137 são revestidos com um

material não-emissivo e não-reflexivo (por exemplo, um epóxi ou tinta escura pouco transparente que não emitirá luz quando submetida à luz de laser UV) para reduzir qualquer luz refletida e/ou emitida destes elementos 133, 137, o que poderia, de outra maneira, ocasionar um ruído de sinal ou ter outros efeitos adversos sobre o sistema óptico 109.

TRANSDUTOR E FORMAÇÃO DE GOTÍCULAS

[00188] O transdutor 105 para introduzir energia no fluxo de fluido 21 compreende, em uma concretização, um colar 379 que contém um elemento piezelétrico (não-mostrado) preso em torno do corpo de fluxo 133 do sistema de bocal 101 (figuras 3-5). O transdutor apresenta um projeto convencional, tal como é disponível pela Ceckman Coulter, Inc., como a peça Nº 6858368. O transdutor apresenta terminais 383 para conexão a uma fonte adequada de energia acústica, de modo que a energia possa ser distribuída para o fluxo de fluido 21 em uma frequência que irá fazer com que ele se rompa em gotículas 33 na localização de ruptura de gotículas 107 a jusante do bocal 137 a uma distância (figura 24). Conforme será entendido por aqueles versados na citometria de fluxo, as características da formação de gotículas são governadas pela seguinte Equação 1:

$$(V = f\lambda) \text{ Equação 1}$$

[00189] onde V é a velocidade do fluxo 21; f é a frequência aplicada ao fluxo de fluido 21 através do bocal 137; e λ é o "comprimento de onda" ou a distância entre as gotículas 33. É um princípio conhecido de citometria de fluxo que as gotículas 33 sejam formadas em um padrão regular com a distância entre as gotículas 33 sendo 4,54 vezes o diâmetro do fluxo 21. Uma vez que o diâmetro D do fluxo 21 próximo ao bocal 137 geralmente corresponde ao diâmetro do orifício do bocal 103 em sua extremidade a jusante, a frequência na qual o fluxo 21 (e o bocal 137) tem que ser vibrada para formar as gotículas 33 pode ser

facilmente calculada com o uso da seguinte Equação 2:

$$(f = V/4,54D) \text{ Equação 2}$$

[00190] O transdutor 105 pode ser operado para gerar na faixa de 30.000 - 100.000 gotículas 33 por segundo. Por exemplo, o transdutor 105 pode gerar 50.000 - 55.000 gotículas por segundo. Assumindo-se que a frequência é de 55.000 ciclos por segundo (55kHz), e adicionalmente assumindo-se que a concentração de células no fluxo 21 é tal que as células saem do bocal 137 em uma taxa substancialmente correspondente de 55.000 por segundo, haverá, em média, uma célula por gotícula 33. (Na realidade, algumas gotículas 33 não conterão quaisquer células, algumas conterão uma célula, e algumas conterão mais de uma célula). Naturalmente, qualquer dos vários fatores pode ser mudado para variar esta média, incluindo uma mudança na frequência (f), no tamanho (D) do fluxo 21 (orifício 103) e na velocidade (V) do fluxo 21. Idealmente, estes fatores devem ser tais de modo a reduzir o grau de esforço conferido às células durante o curso do processo, especialmente no caso das células de esperma onde a preservação da motilidade é importante.

SENSOR DE RUPTURA

[00191] Com referência à figura 2, um sensor de ruptura 389 pode ser empregado para determinar a localização (por exemplo, a localização de ruptura 107) na qual o fluxo 21 começa para formar gotículas livres 33. A localização de ruptura 107 irá variar dependendo de diversos fatores incluindo a viscosidade do fluxo 21, a tensão de superfície do fluido e a amplitude de vibração do transdutor 105. Com o monitoramento da localização de ruptura 107, a amplitude do transdutor 105 pode ser variada para manter a localização de ruptura 107 dentro de uma determinada faixa, de modo que o tempo no qual cada gotícula 33 se rompe possa ser mais precisamente prognosticado pelo microprocessador 131. Isto permite que o microprocessador 131 controle

com precisão a carga elétrica da gotícula 33, o que é conseguido com o controle seletivo da carga do fluxo 21. Uma vez que a carga da gotícula 33 será igual à carga do fluxo 21 imediatamente antes da formação da gotícula 33, o microprocessador 131 controlará a separação das gotículas 33 com o carregamento seletivo do fluxo 21, conforme notado acima.

[00192] Em geral, um sensor de ruptura se destina ao uso com qualquer fluxo contínuo de fluido que é rompido em gotículas em uma localização de ruptura. (Na concretização da figura 2, o sensor de ruptura 389 é localizado a jusante do bocal 137 e da localização de interrogação 115). Um sensor de ruptura exemplificativo 389 é mostrado esquematicamente na figura 25. Uma fonte de luz 393 é posicionada em um lado do fluxo 21 para iluminar o fluxo 21 dentro da determinada faixa na qual a localização de ruptura 107 será mantida. Uma fotodisposição linear 395 posicionada no outro lado do fluxo 21 é adaptada para ser orientada ao longo de um eixo substancialmente paralelo ao fluxo 21. Como resultado, a fotodisposição 395 detecta a luz originária da fonte de luz 393 que passa através das gotículas 33 e confere sinais de saída que correspondem à luz detectada.

[00193] Os sinais de saída são processados para determinarem a posição da localização de ruptura 107. Por exemplo, os sinais de saída podem ser digitalizados e providos para o processador 131 para processamento. Alternativamente, conforme mostrado na figura 25, a fonte de luz 393 pode ser um LED ou outra fonte que gera uma porção aproximada de infravermelho do espectro visível. A luz que passa entre as gotículas 33 é ampliada por uma lente 401 e direcionada para uma disposição linear de fotodiodos de 8 por 1 395. Cada fotodiodo gera uma corrente que é proporcional à intensidade de luz que incide sobre o mesmo. Esta corrente é alimentada em 8 circuitos de op-amp de corrente-tensão 405. A tensão de saída originária dos op-amps é

corrente alternada acoplada em 8 amplificadores de rastreamento/conservação 407. O sinal de rastreamento/conservação 409 usado pelos amplificadores é recebido do transdutor 105. A saída do amplificador de rastreamento/conservação 409 é alimentada no conversor do analógico para o digital 411 de uma unidade de microprocessador (MPU) 391. Os valores digitais computados pela MPU 391 serão providos para o microprocessador de controle de sistema 131. Uma tabela de consulta e/ou algoritmo pode ser usado pelo microprocessador de controle de sistema 131 para converter entre o desvio da localização de ruptura 107 e o ajuste de tensão para o transdutor 105. Alternativamente, a saída do MPU 391 pode ser um sinal analógico, tal como uma tensão DC apresentando uma amplitude que corresponde a uma mudança na amplitude de vibração do transdutor 105. A tensão de corrente contínua pode ser aplicada à entrada do amplificador de alta tensão com o acionamento do transdutor de gotícula 105 para variar a amplitude de vibração. Desse modo, tal processador 391 constituiria um controle para receber o sinal de saída da fotodisposição 395 e prover um sinal de localização que corresponde a uma localização da localização de ruptura 107. Tal processador 391 também constituiria um controle para receber o sinal de saída indicativo da posição da localização de ruptura 107 das gotículas 33 e variar a operação do transdutor 105 como uma função da posição da localização 107.

[00194] Alternativamente, como é bem-conhecido daqueles versados na técnica, uma câmara de vídeo e uma luz de estrobo podem ser usadas para monitorar e controlar a localização de ruptura de gotículas. Assim, conforme mostrado nas figuras 26-27, um sistema de câmara de vídeo 412 e estrobo 413 pode ser provido para monitorar a localização de ruptura 107. É desejável colocar o estrobo 413 atrás de uma máscara 414A (por exemplo, uma cobertura com uma abertura pequena na forma de ranhura 414B) para limitar a quantidade de luz

produzida pelo estrobo 413 que entra no sistema óptico 109 (figura 27).

SISTEMA ÓPTICO DE EPI-ILUMINAÇÃO

[00195] O sistema óptico 109 é adaptado para focalizar um feixe de radiação eletromagnética 25 (por exemplo, um feixe de laser) sobre o fluxo de fluido 21 como um ponto de feixe, de modo que as células a serem analisadas passem através do ponto. O feixe 25 pode ser luz de laser na porção visível ou ultravioleta do espectro, por exemplo, apresentando um comprimento de onda de cerca de 350-700 nm, embora outros comprimentos de onda possam ser usados. O comprimento de onda da luz de laser pode ser selecionado de modo que seja capaz de excitar um fluorocromo específico usado para analisar as partículas. Se o sistema óptico 109 for usado para analisar as células de esperma tingidas com corante Hoechst 33342, por exemplo, o comprimento de onda poderá ser selecionado para ficar na faixa de cerca de 350-370 nm. A saída de tensão do laser pode variar entre 50 e 300 mW. As células de esperma podem ser analisadas com o uso de um laser de 200 mV, por exemplo. Com referência às figuras 28-34, o sistema 109 é um sistema de epi-iluminação 425 que compreende um instrumento, geralmente designado de 417, apresentando um eixo óptico longitudinal 419. Conforme usado aqui, o termo "epi-iluminação" indica um sistema óptico onde pelo menos parte das emissões de fluorescência originárias das células que passam através do ponto de feixe é direcionada de volta através do instrumento óptico ao longo do mesmo eixo como o eixo focalizado 25, mas na direção oposta. Este tipo de sistema é vantajoso pelo fato de apenas um jogo de óptica ser exigido, incluindo apenas um fotodetector 117, diferente dos sistemas convencionais que detectam a fluorescência dianteira ou lateral e que usam dois ou mais fotodetectores. Entretanto, será entendido que enquanto um sistema de epi-iluminação é preferido, muitos dos aspectos desta invenção po-

dem ser aplicados, não obstante o tipo de sistema óptico usado.

[00196] Em uma concretização, o instrumento de epi-iluminação 417 compreende uma base retangular 429 que sustenta uma pluralidade de elementos ópticos. Estes elementos ópticos são descritos abaixo, com exemplos específicos de dimensões relevantes, comprimentos focais, e números de peças. Conforme será entendido por aqueles versados na técnica, esta informação é exemplificativa apenas, e elementos ópticos alternativos podem ser usados sem se afastar do escopo desta invenção.

[00197] Com referência às figuras 28-34, os elementos ópticos incluem um filtro de reflexão 431 que reflete um feixe colimado 25 de luz a partir de uma lâmpada de arco ou laser 435, por exemplo, através de uma montagem de lente de condicionamento 437 montada em uma abertura 439 em uma parede lateral 441 de uma câmara dicróica 443 que se estende para cima a partir da base 429. Nesta concretização específica, a montagem de lente de condicionamento 437 compreende um anel de retenção 445, um filtro de densidade neutra 447, uma lente cilíndrica 449, um suporte de lente 455 e uma de porca de aperto 457. A lente cilíndrica 449 introduz uma divergência unidimensional no feixe 225 e a direciona para os elementos ópticos (descritos abaixo) que formam o feixe para ter uma forma em seção transversal desejada 459, geralmente elíptica, de preferência. Por meio de exemplo, a lente cilíndrica 449 pode ser uma lente plano-convexa apresentando um comprimento focal de 16 mm. Um expensor de feixe (não-mostrado) pode opcionalmente ser instalado no instrumento 417 para permitir que sejam feitos ajustes à forma do ponto de feixe elíptico 459.

[00198] O filtro de reflexão 431 é montado pelos cliques 461 na face angular 465 de um suporte de filtro 463 que apresenta aberturas 467 no mesmo para permitir que o feixe 25 seja refletido do filtro 431 na direção da óptica do instrumento 417. O suporte 463 é preso a um es-

trado linear 469 móvel ao longo de um eixo X 471 com relação ao suporte prolongado 473 preso à base 429 e à câmara dicróica 443, o estrado 489 sendo móvel por um meio adequado 475 (por exemplo, um micrômetro) para localizar com precisão o suporte 483 e o filtro de reflexão 431 para refletir o feixe 25 no instrumento 417 na localização adequada. Um filtro dicróico 477 é mantido pelos cliques 479 em uma armação 485 montada na câmara dicróica 443 e funciona para refletir o feixe formado 25 em uma direção dianteira 487 ao longo de um eixo 489 que, nesta concretização específica, corresponde ao eixo óptico longitudinal 419 do instrumento. O feixe 25 passa através de uma montagem de lente de focalização 491 que focaliza o feixe 25 no fluxo de fluido 21 com um ponto de feixe apresentando a forma geralmente elíptica acima mencionada 459 (figura 6) com o eixo principal da elipse se estendendo geralmente perpendicular à direção de fluxo 227 do fluxo 21. À medida que cada célula passa através do ponto de feixe 459, o corante de fluorescência (ou outro agente indicador) na célula é ativado para emitir luz fluorescente 31 (figura 23). No caso de células de esperma tingidas com um corante fluorescente seletivo de DNA, as células X têm mais DNA do que as células Y, incluem mais corante fluorescente, e emitem um sinal mais forte do que as células Y (por exemplo, 3,8%), que confere uma base para discriminação e separação de células, conforme descrito. A montagem de lente de focalização 491 inclui, em uma concretização, um adaptador de microscópio 501 montado em uma abertura 503 em uma parede dianteira 505 da câmara dicróica 443, um barril de focalização 507, e um par de barris de suporte de lente 509, e a própria lente 511, que pode ser uma lente plano-convexa de 12,5 mm de diâmetro com um comprimento focal de 16 mm, disponível pela Oriel Corporation como a peça número 41209, e é revestida com anti-reflexo para luz apresentando um comprimento de onda na faixa de 340-550 nm. A lente 511 pode ser feita de sílica

fundida. Outras lentes de focalização podem também ser adequadas, tal como uma objetiva de microscópio de fluorescência corrigida pela infinidade. A montagem de lente de focalização 491 apresenta um ajuste de foco telescópico convencional 515 para focalizar o feixe de luz elipticamente formado 459 no núcleo 189 do fluxo 21.

[00199] A luz fluorescente de saída 31 emitida pelas células à medida que elas passam através do ponto de feixe 49 tem um comprimento de onda diferente (mais longo, devido ao princípio de deslocamento de Stoke) do que a luz de laser que entra 25. Parte das emissões de fluorescência 31 é transmitida em uma direção traseira 513 ao longo do eixo de feixe entrante de volta através da lente de focalização 511 que coleta e colima a emissão de fluorescência 31. As emissões de fluorescência colimadas 517 passam em uma direção traseira a partir da lente 511 para o filtro dicróico 477, que transmite a emissão de fluorescência 517. Por meio de exemplo, o filtro dicróico 477 pode ser um filtro disponível pela Omega Optical como a peça número XF2001, 400DCLP.

[00200] O sistema óptico 415 inclui um sistema de filtragem 519 posicionado atrás do filtro dicróico 477 ao longo do eixo óptico 419 do instrumento 417. Em uma concretização, o sistema de filtragem 519 inclui um filtro de emissão 521 em um suporte 523 montado em uma abertura 525 em uma parede traseira 527 da câmara dicróica 443. O filtro de emissão 521 atenua qualquer dispersão de luz de laser ou outra radiação eletromagnética indesejada que é transmitida através do filtro dicróico 477. Por meio de exemplo e não de limitação, o filtro de emissão 521 pode ser um filtro transparente um, um filtro de passagem larga adaptado para transmitir mais que 90% da luz apresentando um comprimento de onda maior do que 408 nm, como é disponível pela Omega Optical como a peça número XF 3097. Uma montagem de película de alinhamento 529 é espaçada para trás ao longo do eixo

óptico 419 a partir do filtro de emissão. Esta montagem inclui um deslizador 531 móvel em um trilho 533 que se estende longitudinalmente da base 429 paralela ao eixo óptico longitudinal 419 do instrumento 417, um suporte de filtro 535 preso ao deslizador 531, um elemento de filtro de película 539, e cliques 541 para prender o elemento de filtro de película 539 ao suporte de filtro 535 em um ângulo 543 com relação ao eixo óptico 419 do instrumento 417. O elemento de filtro de película 539 apresenta a mesma espessura que o filtro dicróico 477 e funciona para transferir a emissão de fluorescência colimada 517 de volta para o eixo óptico 419 do instrumento 417. Prendedores 545 que se estendem através de fendas paralelas 547 na base 429 nos lados opostos do trilho 533 prendem o deslizador 531 à base 429 na posição desejada ao longo do eixo óptico 419. Espaçada para a parte detrás da montagem de película de alinhamento 529 se encontra uma lente asférica 549 mantida por um suporte 551 montado em uma armação 553 que é também deslizável no trilho 533 e presa na posição selecionada por meio de prendedores adequados 557. A lente asférica 549 focaliza a emissão de fluorescência colimada 517 em um filtro espacial, geralmente indicado por 559, que filtra a reflexão ou a emissão de fonte do que as células a serem analisadas. A lente asférica 549 pode ser, por exemplo, uma lente asférica de 12,5 mm de diâmetro apresentando um comprimento focal de 15 mm, como é disponível pela Oriel Corporation. A lente 549 é preferivelmente revestida de anti-reflexo para comprimentos de onda de emissão visíveis, mas feita de um material (por exemplo, vidro de chumbo) que adicionalmente atenua a transmissão de dispersão de luz de laser.

[00201] Conforme mostrado na figura 34, o filtro espacial 559 compreende, em uma concretização, um par de placas de abertura 561 desengatavelmente presas por uma armação 563 montada na base 429 do instrumento 417. Cada uma das placas 561 apresenta uma ra-

nhura 567, 571 na mesma, uma ranhura 567 preferivelmente sendo geralmente vertical e a outra ranhura 571 sendo geralmente horizontal, de preferência, a disposição sendo tal que as ranhuras 567, 571 se intersectem para formar uma abertura 573. Em uma concretização, a abertura 573 é geralmente retangular na forma e apresenta uma dimensão vertical 575 de 100 microns e uma dimensão horizontal 577 de 500 microns. O tamanho e a forma da abertura 573 podem variar (ou mesmo ser ajustados por placas de abertura variável), contanto que ela funcione para remover as reflexões e luz de qualquer fonte diferente do volume de coleta 579. A armação 563 que prende as placas de abertura 561 apresenta preferivelmente duas partes, a saber, um suporte de placa 583 deslizável no trilho 533 da base 429 e preso na posição selecionada pelos prendedores 587, e um membro de apoio 589 para prender as placas de abertura 461 em posição sobre o suporte de placa 583.

[00202] Em uma concretização, a dimensão menor (vertical) 575 da abertura 573 no filtro espacial 559 é dimensionada (ou ajustada) para permitir o uso de uma técnica de "varredura de ranhura" para avaliar a célula. Esta técnica é descrita em maiores detalhes na seção de "Ponto de Feixe Focalizado" deste relatório descritivo.

[00203] Outra concretização de um sistema óptico de epiluminação, geralmente indicado por 450, é mostrado na figura 35. Esta concretização é substancialmente igual à concretização mostrada nas figuras 28-34, salvo conforme indicado. Uma diferença significativa é a de que o filtro dicróico 477 foi substituído por um filtro dicróico diferente 451 que transmite (em vez de refletir) o feixe de iluminação 25 e reflete (em vez de transmitir) as emissões fluorescentes 31. Também, devido ao fato das emissões de fluorescência 31 serem refletidas pelo filtro dicróico 451 do que transmitidas, não há qualquer necessidade de uma película de alinhamento 539 nesta concretização de um siste-

ma óptico de epi-iluminação 450. Assim, o sistema de epi-iluminação 450 é apenas um exemplo de como o sistema óptico pode ser reconfigurado, caso desejado, sem se afastar do escopo desta invenção.

[00204] Adicionalmente, a lente cilíndrica 449 é montada em uma montagem de instalação ajustável 449A. A montagem de instalação 449A permite o movimento de translação de dois eixos da lente cilíndrica 449 em um plano perpendicular ao feixe de iluminação 25. Prendedores desengatáveis (por exemplo, parafusos (não-mostrados)) se estendem através de orifícios na forma de fenda 449B (apenas um dos quais sendo visível na figura 35). O desengate dos prendedores permite o movimento de translação da lente 449 em uma primeira direção perpendicular ao feixe 25. Prendedores similares (não-mostrados) se estendem através de orifícios na forma de fenda 449C, permitindo o movimento de translação da lente 449 em uma segunda direção perpendicular à primeira direção. Isto permite o ajuste secundário das relativas posições da lente cilíndrica 449 e do feixe 25, de modo que a interseção do feixe 25 e da lente 449 possa ser movida através da superfície da lente 449, ocasionando assim ligeiras mudanças à focalização provida pela lente cilíndrica 449. Uma vez que a lente 449 está na posição desejada, os prendedores podem ser apertados para prendê-la aí.

FOTODETECTOR

[00205] A fluorescência emitida que passa através do filtro espacial 559 é lançada sobre um fotodetector 117 preso a uma placa de montagem 591 deslizável no trilho 533 da base 429 na parte detrás do instrumento de epi-iluminação 417 e fixável em posição fixa por prendedores 595 (figura 32). O fotodetector 117 detecta as emissões fluorescentes 31 e as converte em sinais elétricos que podem ser processados para analisar as características desejadas das células, conforme será descrito posteriormente em maiores detalhes. O fotodetector 117

pode ser um dispositivo convencional, tal como um fotodetector disponível pela Hamamatsu. O fotodetector 117 inclui preferivelmente pré-amplificador e ganho PMT que é otimizado para a intensidade de emissão produzida pelo sistema de epi-iluminação para as células tingidas específicas que são analisadas.

[00206] Em geral, o ganho PMT será otimizado, quando entre cerca de 200 e 2000 volts forem aplicados ao tubo de vácuo. No caso de emissões fluorescentes de detecção de corante Hoechst 33342, por exemplo, o ganho PMT será otimizado, quando entre cerca de 400-800 volts forem aplicados ao tubo de vácuo. Um fotodetector particularmente desejável inclui um PMT apresentando uma faixa espectral de 185 - 830 nm (pico de 530 nm), uma corrente de ânodo média máxima de 0,01 mA, uma sensibilidade radiante de cátodo de 70 mA/W típica, uma sensibilidade luminosa de cátodo de 140 μ A/lm, uma sensibilidade luminosa de ânodo de 300 A/lm, uma corrente escura de ânodo máxima de 1 nA (0,1 nA típica), e um tempo de elevação de 1,4 nanossegundo. O PMT é um amplificador acoplado de corrente contínua que demonstra um ganho uniforme para > 37 MHz, apresentando uma saída de pico de 1 V para uma carga de 50 Ω e um tempo de recuperação de menos de 400 nanossegundos. Também é desejável que o amplificador permita um ajuste de alta tensão para compensação das variações de eficiência PMT sem diminuir a relação de sinal-ruído para menos que 800 dB.

ÂNGULO DE INCIDÊNCIA DE FEIXE

[00207] A figura 36 esquematicamente ilustra uma orientação desejável da interseção do feixe de luz e do fluxo de fluido. Diversos pontos são anotados. Conforme mostrado, o feixe de luz 25 é focalizado no fluxo 21 em uma localização 115 que está apenas a uma curta distância 605 a partir do orifício de saída 103 do bocal 137, preferivelmente menor do que 1,0 mm, ou mesmo dentro do bocal 137, de modo que

as células passem através do ponto 459 enquanto ainda estão substancialmente na orientação desejada, conforme anteriormente descrito. Isto é particularmente importante para as células que são móveis no fluxo de fluido 21, incluindo a células de esperma.

[00208] Outro ponto conhecido é o de que o feixe 25 desta concretização pode ser direcionado para o fluxo de fluido 21 ao longo de um eixo de feixe 609 que intersecta o fluxo de fluido 21 em um ângulo de incidência A que é desviado (90 graus) com relação a um eixo longitudinal do fluxo de fluido 21, conforme visto a partir de um lado do fluxo 21 (vide figura 36). Quando da separação de certas partículas, foi considerado que a melhor discriminação de diferentes tipos de partículas pode ser obtida com a iluminação do fluxo 21 em um ângulo de incidência diferente de 0°. Os núcleos de esperma, por exemplo, são desejavelmente iluminados em um ângulo de incidência A que está na faixa de 5 a 45 graus, mais preferivelmente na faixa de 15 a 30 graus, e ainda mais preferivelmente na faixa de 18 a 24 graus. Outras partículas (por exemplo, células de esperma vivas) serão mais fáceis de serem interrogadas, quando o feixe de luz 25 for geralmente perpendicular ao fluxo de fluido 21 (isto é, quando o ângulo A for de cerca de 0°). Assim, é contemplado que o ângulo A pode ser qualquer ângulo sem se afastar do escopo desta invenção.

[00209] A seleção adequada do ângulo A resulta em uma discriminação de sinal-ruído aperfeiçoada em certas partículas e, portanto, em uma discriminação mais precisa com base nas características diferentes dessas partículas (por exemplo, núcleos de esperma com células de esperma de cromossomos X e Y). Este aperfeiçoamento pode se dar devido a inúmeros fatores, incluindo a dispersão de feixe de luz de laser reduzida que entra na lente de focalização 511. Devido ao fato do ponto de feixe focalizado 459 ser preferivelmente mais largo que o fluxo 21, um padrão de difração é criado na interseção 115 do feixe 25

e do fluxo 21. Quando o ângulo A for maior que cerca de 12 graus, o padrão de difração refletido não será lançado sobre a lente 511. Outro fator pode ser aquele em que o ângulo inclinado A permite que o feixe 25 seja focalizado muito próximo ao orifício do bocal 103, de modo que o corpo de bocal 139 não interfira com a lente 511. Associadamente, as células são mais uniformemente alinhadas mais próximas do bocal 137, de modo que a focalização do ponto de feixe 459 mais próximo do bocal 137 resulte em um sinal aperfeiçoado. Adicionalmente, o perfil mais "avançado" da célula apresentada à lente 511 (feixe 25) no ângulo inclinado A reduz a variação da intensidade de fluorescência total causada por qualquer desalinhamento das células. Sob este aspecto, no caso das células de esperma, é preferível que o feixe 25 seja lançado sobre uma das faces largas 207 de cada célula de esperma 201, conforme discutido acima, e que o bocal 101 e o sistema óptico 109 seja posicionado para atingir este resultado.

[00210] Enquanto acredita-se que um ângulo inclinado de incidência A seja benéfico na separação de algumas partículas, é contemplado que o ângulo de interseção entre o eixo de feixe e o fluxo possa ser de 90 graus ou qualquer ângulo inclinado sem se afastar do escopo desta invenção. Também é esperado que o ângulo ótimo de incidência possa variar amplamente dependendo das propriedades das partículas específicas que são analisadas.

PONTO DE FEIXE FOCALIZADO

[00211] Com referência à figura 6, o ponto de feixe focalizado de uma concretização é mostrado como tendo uma forma geralmente elíptica (oval) 459 com um comprimento L1 ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos à direção do escoamento do fluxo de fluido 27 e uma largura W1 ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralelo à direção do escoamento do fluxo de fluido 27. Em uma concretização, a largura W1 é

menor que o comprimento da cabeça da célula de esperma 219, e ainda mais preferivelmente menor do que o comprimento da região 225 contendo a massa de DNA cromática da célula, que, no caso de uma célula de esperma bovina 201, apresenta um comprimento menor do que cerca de $1\text{ }\mu\text{m}$. Para um fluxo 21 apresentando fluido de revestimento 191 que é de cerca de $60\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro e um fluxo de núcleo 189 contendo células de esperma bovino 201, um comprimento exemplificativo L é de cerca de $80\text{ }\mu\text{m}$ e uma largura exemplificativa W1 é de cerca de $1,5\text{ }\mu\text{m}$. Com a focalização do ponto de feixe 459 em uma largura W1 que é menor do que o comprimento da cabeça 205 da célula de esperma 201, ou qualquer outra célula de esperma ou partícula que é analisada, e ainda mais preferivelmente menor que o diâmetro da região de DNA 225 da cabeça 205 da célula de esperma 201, uma maior resolução de sinal é conseguida, conforme será entendido por aqueles versados na técnica de "varredura de ranhura". Esta é uma técnica pela qual um feixe 25 é estreitado para ter uma largura menor que o comprimento de uma célula (isto é, a dimensão da célula na direção do escoamento de fluxo), de maneira que à medida que a célula se move através do feixe estreito, as emissões de fótons 31 originárias da célula são medidas sobre um comprimento da célula, conforme será discutido posteriormente. Desta forma, a informação pode ser obtida a cerca das variações na estrutura, incluindo o material de DNA, ao longo do comprimento da célula. Esta técnica de varredura de ranhura é também útil na identificação de células "coincidentes", isto é, células que são sobrepostas ou muito próximo umas das outras.

[00212] Conforme anteriormente mencionado, a varredura de ranhura pode também ser executada pelo dimensionamento da abertura 573 do filtro espacial 559 para se ter uma dimensão vertical 575, de tal modo que apenas uma porção da luz emitida de uma célula, correspondente a uma fração do comprimento da célula na direção do esco-

amento de fluxo, passe através da abertura para o fotodetector 117. Adicionalmente, a resolução de sinal pode ser otimizada pelo ajuste da largura do feixe e/ou do tamanho da abertura do filtro espacial para trabalharem entre si para proverem um ponto de feixe que é adequadamente formado para a varredura de ranhura.

[00213] Uma maneira de ajustar a forma do ponto de feixe 459 é com a mudança para uma lente cilíndrica diferente e/ou com a criação de um ajuste para um expensor de feixe no sistema óptico 109. Adicionalmente, qualquer processo de formação de feixe 25 para formar um ponto de feixe elipticamente formado 459 é contemplado como estando dentro do escopo da presente invenção. Pontos de feixe de outras formas e tamanhos podem também ser usados e são contemplados como estando dentro do escopo desta invenção.

SISTEMA DE SEPARAÇÃO

[00214] A figura 2 ilustra uma concretização exemplificativa do sistema de separação 119. O sistema de separação 119 compreende um dispositivo de carregamento eletrostático 627 para carregar e/ou não carregar as gotículas 33 dependendo da classificação das partículas contidas nas gotículas 33 (por exemplo, o teor de cromossomo X/Y das células de esperma), e um par de placas defletoras carregadas eletrostáticas 629 para separar as gotículas 33 em diferentes grupos 123, 125, de acordo com sua carga. É desejável revestir as placas defletoras 629 com um revestimento opaco de baixa emissão (por exemplo, epóxi ou tinta) para limitar luz refletida ou emitida pelas placas defletoras 629. As placas defletoras 629 podem ser carregadas por qualquer suprimento de energia adequado 635. Geralmente é desejável que o potencial elétrico entre duas placas defletoras totalmente carregadas 629 esteja na faixa de 2000 - 4000 volts. Contudo, o potencial elétrico entre as placas defletoras 629 pode estar em qualquer lugar entre cerca de 1000 e 6000 volts.

[00215] O dispositivo de carregamento 627 compreende um elemento de carregamento 631 apresentando uma abertura 633 no mesmo, através da qual o fluxo 21 passa em uma localização próximo da localização de ruptura de gotículas 107 (por exemplo, dentro de cinco comprimentos de gotículas ou mais próximo). É desejável montar o elemento de carregamento 631 com um mecanismo que facilite o ajuste da posição do elemento de carregamento 631 com relação à localização de ruptura de gotícula 107. Conforme mostrado nas figuras 26 e 27, por exemplo, o elemento de carregamento 631 e as placas defletoras 629 podem ser conectados a uma montagem de instalação ajustável 5001 que permite a translação de três eixos e o ajuste inclinado do elemento de carregamento 631 e placas defletoras 629 com relação ao sistema de bocal 101. Para a translação ao longo de um eixo 5011 paralelo ao fluxo 21, a montagem de instalação 5001 inclui uma placa 5003 presa a um apoio 5005 por meio de prendedores desengatáveis 5007 que passam através de fendas 5009 na placa 5003, as fendas 5009 sendo orientadas geralmente paralelas ao eixo 5011. Para a translação em um eixo 5013 perpendicular ao fluxo 21, uma segunda placa de ajuste 5015 é presa à primeira placa 5003 por prendedores desengatáveis 5017 que passam através de fendas 5019 na segunda placa de ajuste 5015, as fendas 5019 sendo orientadas geralmente paralelas ao eixo 5013. O elemento de carregamento 631 e as placas defletoras 629 são presos à segunda placa de ajuste 5015. Desse modo, com o desengate dos prendedores 5007 e/ou 5017, pode-se ajustar a posição do elemento de carregamento 631 e das placas defletoras com relação ao sistema de bocal 101 em um plano paralelo ao fluxo de fluido 21 e então apertar os prendedores 5007 e/ou 5017 para prender a montagem de instalação 5001.

[00216] Para a translação ao longo de um terceiro eixo perpendicular aos dois primeiros eixos 5011, 5013, o apoio 5005 é preso em um

suporte fixo 5021 por prendedores ajustáveis 5023 (por exemplo, cavi-lhas rosqueadas nos orifícios roscados no suporte fixo 5021). Em uma concretização, cada prendedor ajustável 5023 passa através de uma mola 5025 posicionada entre o apoio 5005 e o suporte fixo 5021. O grau de compressão de qualquer mola 5025 pode ser ajustado com o aperto ou o afrouxamento do respectivo prendedor 5023. O ajuste da compressão de todas as molas 5025 no mesmo grau resulta na translação ao longo do terceiro eixo. A montagem de instalação 5001 pode ser inclinada virtualmente em qualquer direção com a mudança da relativa compressão de uma ou mais molas 5025 com relação a uma ou mais outras molas 5025.

[00217] Nesta concretização exemplificativa, as relativas posições do elemento de carregamento 631 e placas defletoras 629 permanecem fixas entre si porque elas são todas presas na mesma placa de ajuste 5015. Isto impede que o ajuste da montagem de instalação 5001 afete o alinhamento do elemento de carregamento 631 com relação às placas defletoras 629.

[00218] O elemento de carregamento 631 é conectado a um circuito elétrico adequado (por exemplo, um circuito de carregamento seletivo de 90 volts) sob o controle do processador 131 e acoplado a um suprimento de energia para aplicar uma carga elétrica ao elemento de carregamento 631. O circuito é usado para carregar ou não carregar o fluxo 21 imediatamente antes da formação de uma gotícula 33 na localização de ruptura 107 dependendo de se a gotícula 33 contém ou não uma partícula apresentando as características desejadas (por exemplo, pelo menos uma célula de espermatozoário de cromossomo X viva). O elemento de carregamento 631 é posicionado eletrostaticamente próximo do fluxo 21 ou perto das gotículas 33 formada no fluxo 21 para prover uma referência elétrica com relação à polaridade eletrostática do fluxo 21. As gotículas 33 conduzem a mesma carga que o fluxo 21

no momento em que a gotícula 33 é rompida do fluxo 21. As gotículas carregadas ou não-carregadas 33 passam então entre as placas defletoras 629 e são separadas pela carga em vasos de coleta 2207 do sistema de coleta 2201. Enquanto a separação produz dois grupos ou populações de gotículas 123, 125 na figura 2, as partículas podem ser separadas em qualquer número de populações de 1 a N separadas com a imposição de diferentes cargas sobre as gotículas 33 nos respectivos grupos, qualquer por meio do suprimento do número apropriado de vasos de coleta, cada qual sendo posicionado para coletar uma população diferente de gotículas.

CALIBRAÇÃO AUTOMATIZADA DE RETARDAMENTO DE GOTA

[00219] No sistema de separação 119 descrito acima, o processador 131 tem que estimar o tempo que é levado para que uma partícula se mova da localização de interrogação 115 para a localização de ruptura de gotícula 107, de modo que a carga (ou falta de carga) a ser aplicada à gotícula 33 contendo essa partícula seja aplicada quando a partícula estiver na última gotícula conectada 33 na localização de ruptura 107. Se o ajuste de retardamento usado pelo processador 131 for errado, as gotículas 33 não serão separadas de acordo com seus teores. Similarmente, se a aplicação de cargas elétricas às gotículas 33 estiver ainda ligeiramente fora de fase com a formação de gotículas 33, isto poderá degradar a separação pelo fato de nenhuma das gotículas 33 estar completamente carregada e das gotículas 33 que se supõe terem carga neutra conduzirem uma carga elétrica positiva ou negativa. Isto irá alterar os percursos das gotículas 33 através do campo elétrico entre as placas de deflexão 629.

[00220] O melhor modo de verificar que o processador 131 está usando o ajuste de retardamento apropriado ou de ajustar o ajuste de retardamento de gota (isto é, calibrar o ajuste de retardamento de que do sistema) é o de separar inúmeras gotículas 33 e examinar os resul-

tados. Com a variação incremental do ajuste de retardamento e o monitoramento dos resultados, pode-se selecionar o ótimo ajuste de retardamento. Tradicionalmente, esta calibração de separação é executada manualmente. Recentemente, sistemas automatizados de calibração foram projetados para amostrarem ou examinarem os teores das gotículas nos fluxos de gotículas separados e automaticamente ajustarem o ajuste de retardamento sem a intervenção humana. Por exemplo, as Patentes U.S. N^{os} 6.372.506 (Norton) e 5.643.796 (van den Engh), que são aqui incorporadas para referência, descrevem sistemas automatizados de calibração de separação. As vantagens pretendidas destes sistemas são as de que eles são menos trabalhosos e são capazes de verificarem o ajuste de retardamento por todo o processo de separação do que apenas durante a configuração inicial. As desvantagens são as de que eles são volumosos e ocupam espaço valioso desnecessariamente.

(i) Sensores de Epi-iluminação

[00221] Com referência à figura 37, um sistema automatizado de calibração contínua 4201 da presente invenção para um sistema de citometria de separação de gotículas ativado de fluorescência compreende um ou mais sensores de epi-iluminação 4203 posicionados para detectarem os teores das gotículas 33 para verificar o ajuste de retardamento para o carregamento de gotículas. Com referência à figura 38, cada sensor de epi-iluminação inclui uma fonte de luz (não-mostrada), um cabo de fibra óptica 4205, um filtro dicróico 4207, um sistema de lente 4209, um fotodetector 4213, e um sistema de controle. Em uma concretização exemplificativa, o processador 131 serve como o sistema de controle, mas outros processadores ou controles poderiam ser usados no lugar.

[00222] A fonte de luz pode ser um laser de estado sólido de baixa potência dedicado unicamente ao sistema automatizado de calibração

4201. Alternativamente, um divisor de feixe (não-mostrado) pode ser usado para desviar uma porção (por exemplo, cerca de 5%) da energia no feixe 25 usado para interrogação de partículas no fluxo de fluido 21 para um ou mais sensores de epi-iluminação 4203. Similarmente, o cabo de fibra ótica 4209 pode ser posicionado em um ponto de feixe 4215 (figura 26) para agrupar luz originária do feixe 25 depois que ela passa através da localização de interrogação 115. A luz originária da fonte de luz tem que incluir luz apresentando um comprimento de onda capaz de excitar moléculas fluorescentes nas partículas que são separadas, produzindo assim emissões de fluorescência 4211 originárias das partículas. Se as partículas forem tingidas com corante Hoechst 33342, por exemplo, a fonte de luz poderá prover luz apresentando um comprimento de onda de cerca de 350 nm, de cerca de 407 nm ou de qualquer outro comprimento de onda capaz de excitar as moléculas do corante Hoechst 33342.

[00223] O cabo de fibra ótica 4205 se estende a partir da fonte de luz para uma localização a jusante da localização de interrogação 115. Por exemplo, na concretização exemplificativa, o cabo de fibra ótica 4205 leva a uma localização adjacente à trajetória de um dos fluxos de gotículas à medida que ele se move através do campo elétrico entre as placas defletoras 629. O filtro dicróico 4207 é posicionado em frente da extremidade do cabo de fibra ótica 4205. O filtro dicróico 4207 transmite luz apresentando as características espectrais da luz conduzida pelo cabo de fibra ótica 4205, mas reflete a luz apresentando as características espectrais das emissões de fluorescência 4211. Desse modo, o filtro dicróico 4207 pode ter as mesmas especificações que o filtro dicróico 477 descrito acima em conexão com o instrumento óptico de epi-iluminação 417. O comprimento focal do sistema de lente 4209 é selecionado com base na distância esperada do sensor 4203 a partir das gotículas 33, de modo que o volume de iluminação/detecção de

cada sensor 4203 seja aproximadamente igual ao volume de gotículas 33.

[00224] Com referência à concretização exemplificativa mostrada na figura 37, um sensor de epi-iluminação 4203 é posicionado adjacente à trajetória de cada um dos três fluxos de gotículas separadas 4225, 4227, 4229 para detectar os conteúdos das gotículas 33 em um respectivo fluxo. O sistema de citômetro 9 inclui um suporte eletricamente isolado 4221 para montar as duas placas de deflexão 629. O suporte apresenta três orifícios 4223, um adjacente à trajetória de cada fluxo de gotícula separada 4225, 4227, 4229. Um sensor de epi-iluminação 4203 é posicionado em cada orifício 4223 para observar as gotículas 33 em um dos fluxos de gotículas 4226, 4227, 4229 através do respectivo orifício 4223. Esta configuração compacta ocupa relativamente pouco espaço e mantém os componentes do sistema de calibração 4201 fora do caminho, provendo um melhor acesso a outras partes do citômetro 9.

[00225] Se uma gotícula contendo uma partícula fluorescente passar através do volume de iluminação/detecção do sensor 4203, isto irá resultar em uma descarga de emissões de fluorescência 4211, parte da qual será coletada pelo sistema de lente 4209 e refletida do filtro dicróico 4207 para o fotodetector 4213. Os sinais originários do fotodetector 4213 são providos ao processador 131. Com base nos sinais recebidos dos fotodetectores 4213, o processador 131 pode determinar os teores das gotículas 33 em cada um dos fluxos de gotículas separadas 4225, 4227, 4229.

[00226] Se um sensor 4203 deixar de detectar uma descarga de emissão de fluorescência 4211, quando o processador 131 esperar que uma gotícula 33 contendo uma partícula fluorescente passe por esse sensor 4203, o processador 131 poderá usar essa informação para ajustar o ajuste de retardamento ou ajustar a localização da loca-

lização de ruptura de gotícula 107. Do mesmo modo, o processador 131 poderá fazer um ajuste, se um sensor 4203 detectar uma emissão fluorescente 4211, quando o processador 131 não esperar que uma gotícula 33 contendo uma partícula seja passada pelo sensor 4203. Adicionalmente, o processador poderá comparar a relativa frequência de emissões fluorescentes 4211 originárias dos fluxos separados 4225, 4227, 4229 para ver se a frequência de emissões fluorescentes detectadas 4211 se casa com a frequência esperada. O processador 131 pode também ajustar a amplitude da carga aplicada ao elemento de carregamento 631 para aumentar ou diminuir a quantidade pela qual um fluxo separado 4225, 4229 é detectado para maximizar a intensidade das emissões de fluorescência detectadas 4211. Isto irá manter o alinhamento da trajetória dos fluxos de gotículas detectados 4225, 4229, de modo que as gotículas passem diretamente através do volume de coleta do sensor de epi-iluminação. Devido ao fato dos sensores 4203 serem posicionados para observarem os fluxos 4225, 4227, 4229, à medida que eles se movem através do campo elétrico entre as placas defletoras 629, o sistema de calibração apresenta um tempo de resposta mais curto do que seria observado se ele observasse os fluxos 4225, 4227, 4229 na área de queda livre a jusante das placas de deflexão.

(ii) Fluxo de Teste de Gotículas Vazias

[00227] Uma indicação sensível da qualidade da calibração pode ser disposta com a criação e o monitoramento de um fluxo de teste de calibração que contém substancialmente apenas gotículas vazias 33. Com referência ao sistema de calibração de separação 4201 mostrado na figura 37, as gotículas 33 contendo partículas desejadas são separadas no fluxo 4225 e gotículas 33 contendo quaisquer outras partículas, e a maior parte das gotículas vazias 33 é separada no fluxo 4229 (isto é, o fluxo de resíduos). O fluxo de teste 4227 é criado com a apli-

cação de uma carga neutra para pelo menos uma fração (por exemplo, 1 de cada 10) das gotículas vazias 33. Muitas gotículas 33 que são consideradas "vazias" para fins de separação tradicionais são, na verdade, gotículas 33 para as quais há uma baixa probabilidade da gotícula 33 conter uma partícula, com base no tempo de chegada das partículas na localização de interrogação 115 e limites de formação de gotículas estimados no fluxo de fluido 21. Estas gotículas "vazias" não devem ser separadas no fluxo de teste 4227 porque isto inevitavelmente resultaria na detecção de algumas partículas no fluxo de teste 4227.

[00228] Em vez disso, para o fluxo de teste 4227, o processador 131 deve selecionar apenas gotículas 33 que o processador 131 acredita ter probabilidade substancialmente zero de conter uma partícula, a fim de criar um fluxo de teste substancialmente isento de partículas 4227. É conhecida a probabilidade de qualquer gotícula aleatoriamente selecionada 33 conter uma célula, sendo aproximadamente a taxa de análise de célula média dividida pela taxa de geração de gotículas. Isto indica que com o monitoramento da taxa de separações errôneas no fluxo de teste 4227, é possível estimar o ajuste fracional da relação de fase de carregamento de gotículas necessário para corresponder à fase da formação de gotículas 33. Por exemplo, o processador 131 pode selecionar gotículas que ele estime como tendo cerca de 15% ou uma baixa probabilidade de conter uma partícula, cerca de 10% ou uma baixa probabilidade de conter uma partícula, cerca de 5% ou uma baixa probabilidade de conter uma partícula, cerca de 1% ou uma baixa probabilidade de conter uma partícula, cerca de 0,1% ou uma baixa probabilidade de conter uma partícula, cerca de 0,01% ou uma baixa probabilidade de conter uma partícula, cerca de 0,001% ou uma baixa probabilidade de conter uma partícula, ou cerca de 0,0001% ou uma baixa probabilidade de conter uma partícula. O corte probabilístico pa-

ra uma probabilidade substancialmente zero pode ser selecionado com base na velocidade de separação, na tolerância à impureza, ou em outros parâmetros de separação, com o corte incluindo probabilidades mais altas de que uma gotícula incluirá uma partícula para a separação de alta velocidade ou quando houver uma maior tolerância para impureza.

[00229] A falha do processador 131 para criar um fluxo de teste substancialmente isento de partículas 4227 (isto é, um fluxo de teste 4227 no qual a proporção das gotículas 33 contendo partículas - número total de gotículas 33 está de acordo com o corte probabilístico usado para selecionar gotículas 33 para o fluxo de teste 4227), conforme indicado pela detecção de mais de um número limite de gotículas 33 contendo partículas no fluxo de teste 4227, é uma indicação definitiva de separação subótima e apronta o processador 131 para ajustar o ajuste de retardamento de gota. O nível limite é determinado em relação ao corte probabilístico usado para selecionar gotículas 33 para o fluxo de teste 4227 e o número total de gotículas 33 selecionadas para o fluxo de teste 4227. Idealmente, algumas gotículas 33 podem ser selecionadas para o fluxo de teste 4227, embora uma ou mais partículas no fluxo de fluido 21 estejam relativamente próximas de um limite de formação de gota estimado para que a respectiva gotícula 33 torne o sistema 4201 mais sensível a ajustes de retardamento de gota ligeiramente subótimos.

[00230] Naturalmente, o sistema de calibração poderia aplicar uma carga não-neutra para as gotículas e defletir gotículas selecionadas para o fluxo de teste, sem se afastar do escopo desta invenção. A relativa ordem dos fluxos 4225, 4227, 4229 poderia também ser redistribuída sem se afastar do escopo desta invenção, embora a interposição do fluxo de teste 4227 entre o fluxo de resíduos 4225 e o fluxo de partículas desejadas 4229 (conforme mostrado na concretização exemplifica-

tiva) reduz o risco de contaminação cruzada da amostra separada pelo fluxo de resíduos. Adicionalmente, se as partículas não emitirem luz fluorescente, diferentes sensores poderão ser usados para detectarem qualquer luz dispersa causada pelas partículas no fluxo de teste sem se afastar do escopo desta invenção.

(iii) Sistema de Calibração de separação

[00231] Em uma concretização da invenção, o sistema de calibração automatizado 4201 é operável para automaticamente determinar e ajustar a relação de fase entre a formação de gotículas e o carregamento de gotículas para dentro de cerca de 5% da fase ótima (isto é, dentro de +/- cerca de 18 graus. Em outra concretização, o sistema 4201 é operável para automaticamente determinar e ajustar a relação de fase para dentro de cerca de 1% da ótima fase (isto é, dentro de +/- cerca de 3,6 graus)). Em outra concretização, o sistema de calibração 4201 é operável para continuamente monitorar um sistema de separação de gotícula de alta velocidade e automaticamente manter a relação de fase dentro de cerca de 10% da ótima fase (isto é, dentro de +/- cerca de 36 graus). Em ainda outra concretização, o sistema 4201 é operável para continuamente monitorar um sistema de separação de gotícula de alta velocidade e automaticamente manter a relação de fase dentro de cerca de 3% da ótima fase (isto é, dentro de +/- 10,8 graus).

CORREÇÃO DE FALHA DO SISTEMA DE SEPARAÇÃO

[00232] De tempos em tempos, uma gotícula 33 irá se perder de sua trajetória normal e atingir o elemento de carregamento 631 ou as placas defletoras 629. Se uma ou mais gotículas 33 atingir o elemento de carregamento 631, o elemento de carregamento 631 poderá não carregar as gotículas 33 adequadamente. Adicionalmente, a trajetória normal da gotícula 33 através do elemento de carregamento 631 poderá ficar obstruída fazendo com que ainda mais gotículas 33 se acumu-

lem no elemento de carregamento 631. Também, se as gotículas de dispersão 33 atingirem uma placa defletora 629, elas poderão distorcer ou, de outra maneira, romper as linhas de campo elétrico entre as placas defletoras 629, mudando assim a trajetória dos fluxos de gotículas separados 123, 125.

[00233] Assim, é desejável se ter um sistema de remoção de detritos para remover os detritos do elemento de carregamento 631 e/ou as placas defletoras 629. Em uma concretização exemplificativa, mostrada nas figuras 26 e 27, o sistema 9 inclui um sistema de remoção de detritos 5047 para o elemento de carregamento 631 e um sistema de remoção de detritos 5049 para as placas defletoras 629.

[00234] Com referência à figura 27, o elemento de carregamento 631 é mantido em posição por meio de um suporte 5051 preso à placa 5015 da montagem de instalação ajustável 5001. Uma passagem de vácuo 5053 (mostrada em sombreado) se estende através do suporte 5051 para uma abertura 5057 adjacente ao elemento de carregamento 631. A passagem de vácuo 5053 é conectada a uma fonte de vácuo adequada (não-mostrada) por uma linha de vácuo 5055 conectada a um encaixe 5058 no suporte 5051. Controles adequados são providos para seletivamente aplicar um vácuo na passagem 5053 para prover de vácuo qualquer material indesejado (por exemplo, gotículas de dispersão 33) do elemento de carregamento 631 e restaurar a função adequada do elemento de carregamento 631.

[00235] Associadamente, conforme mostrado na figura 27, uma tubulação 5061 presa à montagem de instalação 5001 dispõe de uma rede de passagens de ar 5083 na mesma (mostrada sombreado) conectada através de uma linha de ar 5059 e encaixe 5065 a uma fonte de ar comprimido ou outro gás (não-mostrado). As passagens 5063 apresentam aberturas 5064 posicionadas ao longo de um lado 5066 de cada placa defletora 629, e as porções 5087 das passagens 5063

que levam para as aberturas 5065 são orientadas de modo que o ar comprimido soprado através da tubulação 5061 venha a liberar quaisquer gotículas de dispersão 33 ou outros detritos das placas defletoras 629. Qualquer material soprado das placas defletoras 629 irá atingir um painel de cobertura (não-mostrado) e drenar em um dispositivo de coleta de resíduos adequado (não-mostrado).

[00236] Em uma concretização, se o processador ou outro sensor determinar que as gotículas de dispersão 33 irão atingir o elemento de carregamento 631 ou placas defletoras 629, conforme indicado pelo sistema de calibração de separação descrito acima, por exemplo, o processador poderá automaticamente iniciar um procedimento de correção de falha ou modo, que poderá incluir a aplicação de um vácuo à passagem 5053 para prover de vácuo o material do elemento de carregamento 631 e/ou enviar gás comprimido através das passagens 5067 para soprar o material das placas defletoras 629.

PROTEÇÃO DE AMOSTRA SEPARADA DURANTE MODO DE FALHA

[00237] Uma concretização do sistema 9 também inclui um mecanismo de prevenção de contaminação 4041 (figura 26), que pode ser ativado pelo processador 131 para limitar ou impedir a contaminação da amostra separada em qualquer momento que o sistema esteja no modo de correção de falha. O mecanismo de prevenção de contaminação inclui um atuador pneumático 4043 operável para seletivamente mover um braço de oscilação 4045 entre uma posição de blindagem (mostrada na figura 26) e uma posição de não-blindagem (não-mostrada). Na posição de blindagem, a extremidade 4047 do braço de oscilação 4045 cobre a abertura do vaso de coleta 4033, impedindo assim a coleta de gotículas 33 pelo vaso de coleta 4033. Na posição de não-blindagem, o vaso de coleta 4033 está descoberto. Normalmente, o braço de oscilação 4045 está na posição de não-blindagem,

mas o processador 131 faz com que o atuador 4043 mova o braço de oscilação 4045 para a posição de blindagem em qualquer momento que o processador 131 determine que há um risco de contaminação (por exemplo, o sistema de bocal 101 fica obstruído, e a localização de ruptura de gotículas 107 fica instável, ou as gotículas de dispersão 33 atingiram o elemento de carregamento 631 ou placas defletoras 629). A extremidade 4047 do braço de oscilação 4045 tem a forma de uma gamela para drenar qualquer fluido coletado pelo braço de oscilação 4045 no recipiente de resíduos 4035.

SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO DE FLUIDO

[00238] O sistema 1 descrito acima é capaz de eficazmente produzir quantidades de partículas (por exemplo, células de esperma X) separadas pelas características selecionadas. A taxa de produção pode ser aumentada ou diminuída com a variação das taxas nas quais o sistema de distribuição de fluido 15 (figura 2) distribui o fluido catalisador 17 e o fluido de revestimento 19 para o bocal 137. Em uma concretização, o sistema de distribuição de fluido inclui uma bomba de seringa 645, um exemplo de tal bomba sendo o Modelo PSD/3 da MICROLAB® disponível pela Hamilton Company. A bomba 645 é operável para dispensar fluido catalisador 17 no bocal 137 em uma taxa na faixa de 10 - 50 µl/min. A bomba 645 é conectada a uma linha de fluxo 647 ao suprimento 3 do fluido catalisador 17, que pode ser um vaso adequado 649 contendo um volume de material a ser analisado e separado. Quando a temperatura das partículas que são analisadas for um fator, como no caso de células de esperma, por exemplo, a temperatura do vaso 649 poderá ser controlada por um sistema de controle de temperatura adequado, tal como um banho de aquecimento/resfriamento (não-mostrado). A bomba de seringa 645 é móvel através de um curso de admissão para aspirar fluido catalisador do vaso de suprimento e através de um curso de descarga para dispensar flui-

do transportador 17 através de uma linha de suprimento 651 para a agulha de injeção 157 do sistema de bocal 101. A bomba 645 é preferivelmente acionada por um motor de velocidade variável (não-mostrado) sob o controle do processador 131. Por meio de exemplo, a bomba 645 pode ser acionada por um motor escalonador que opera em taxas seletivamente variáveis para bombear fluido catalisador 17 para a agulha 159 em taxas necessárias pra se obter o rendimento desejado. Outros tipos de dispositivo de distribuição de fluido podem ser usados no lugar de uma bomba de seringa. Para prover apenas um exemplo, o vaso 649 pode ser pressurizado por uma fonte de gás pressurizado sem se afastar do escopo da invenção. Adicionalmente, é desejável manter as linhas 647, 651 tão curtas quanto praticamente possível, porque o ambiente da linha não é útil à saúde das células sensíveis (por exemplo, as células de esperma) que podem estar no fluido catalisador 17.

[00239] O suprimento 7 de fluido de revestimento 19 compreende um segundo vaso 661, por exemplo, um tanque na figura 2, detendo um volume apropriado de fluido de revestimento 19 conectado ao orifício radial 173 no corpo de fluxo 133 do sistema de bocal 101 por uma linha de suprimento 667 apresentando uma válvula de controle 669 no mesmo. Na concretização da figura 1, o vaso de fluido de revestimento 661 é pressurizado por um sistema de pressão de gás 671 que compreende uma fonte 675 de gás pressurizado (por exemplo, ar ou outro gás, tal como nitrogênio) que se comunica com o tanque 661 através de uma linha de ar 679 apresentando um regulador 681 no mesmo para controlar a pressão suprida para o tanque 661. Uma válvula de duas vias 683 na linha de ar 679 é móvel entre uma primeira posição que estabelece a comunicação entre o tanque 661 e a fonte de gás 675 e uma segunda posição que ventila o tanque 661. Uma válvula de duas vias 683 na linha de ar 679 é móvel entre uma primeira posição que

estabelece a comunicação entre o tanque 661 e a fonte de gás 675, e uma segunda posição que ventila o tanque 661. O regulador de pressão de gás 681 é um regulador convencional preferivelmente sob o controle do processador 131. Com o controle da pressão do tanque 661, a pressão na qual o fluido de revestimento 19 é dispensado no corpo de fluxo 133 pode também ser controlada. A pressão pode variar de 110 a 687,5 kPa (16 a 100 psi), mais preferivelmente de 68,75 a 343,75 kPa (10 a 50 psi), ainda mais preferivelmente, de 103,125 a 275 kPa (15 a 40 psi), e ainda mais preferivelmente, de cerca de 137,5 a 206,25 kPa (20 a 30 psi). A pressão na qual o fluido de revestimento 19 é suprido ao corpo de fluxo 133 pode ser controlada de outras maneiras sem se afastar do escopo da invenção.

[00240] Em uma concretização, mostrada na figura 26, o sistema de distribuição de fluido 15 inclui um tanque de fluido de revestimento (não-mostrado) e uma estação de amostra 4051. A estação de amostra inclui um recipiente de pressão de duas partes 4053 adaptado para prender um tubo de amostra 4055. A seção inferior 4057 do recipiente de pressão é móvel para cima e para baixo com relação à seção superior 4059 do recipiente de pressão 4053 entre uma posição aberta (mostrada na figura 26), na qual o tubo de amostra 4055 pode ser carregado ou descarregado, e uma posição fechada (não-mostrada) na qual as duas partes 4057, 4059 do recipiente de pressão 4053 se juntam para formarem uma vedação para conter o gás pressurizado usado para bombear o fluido catalisador 17 do tubo de amostra 4055 para o sistema de bocal 101.

[00241] Quando o recipiente de pressão estiver aberto, um braço de oscilação pressionado por mola 4071 se moverá para uma posição abaixo da linha 651 que distribui fluido catalisador 17 para o sistema de bocal 101 (vide também a figura 119 nº 4071'). O braço de oscilação 4071 tem a forma de uma gamela e é adaptado para coletar flui-

do descarregado de volta através da linha 651 e drenar o fluido descarregado de volta para o recipiente de resíduos através do orifício 4073. À medida que o recipiente de pressão 4053 se move de sua posição aberta para sua posição fechada, uma placa de came 4075 conectada à seção inferior 4057 do recipiente de pressão 4053 moverá o braço de oscilação 4071 contra seu pressionamento de mola para liberar a área entre as duas seções 4057, 4059 e permitir que o recipiente de pressão 4053 se feche.

CONTROLE

[00242] Com referência novamente à figura 2, o microprocessador 131 (ou outro controle digital ou analógico e/ou processador, ou combinações do mesmo) controla a operação do sistema 1. Conforme notado abaixo com relação à figura 39, o microprocessador pode ser implementado como um processador de controle de sistema e quatro processadores para manipular o processamento de sinal. Por exemplo, o microprocessador de controle de sistema (vide figura 36) pode ser implementado com o uso de um dos quatro processadores de processamento de sinal. Além disso, conforme notado abaixo, o processamento de sinal pode ser implementado por um circuito analógico (por exemplo, um analisador de célula analógico, conforme mostrado na figura 39) ou uma combinação de circuitos analógicos e digitais.

[00243] O microprocessador 131 supre sinais de saída para controlar o sistema de distribuição de fluido 15 (indicado abaixo) em resposta a sinais de entrada recebidos do sistema de epi-iluminação 415, supre sinais de saída para controlar os transdutores 105 em resposta aos sinais de entrada recebidos dos sensores de ruptura 389, e supre sinais de saída para controlar o sistema de separação 119 (indicado abaixo) em resposta aos sinais de entrada recebidos do sistema de epi-iluminação 415. O microprocessador 131 pode prover sinais de saída para outras partes do sistema de citometria 9, conforme notado

em algum outro lugar aqui. Adicionalmente, o processador 131 pode ser adaptado para processar informação e prover sinais de saída em tempo real. Amplamente falando, o termo "tempo real" refere-se a operações nas quais a operação do processador 131 se casa com a percepção humana de tempo ou aquelas em que a taxa da operação do processador 131 se casa com a taxa de processos físicos ou externos relevantes. Em um contexto, o termo "tempo real" pode indicar que o sistema reage aos eventos antes que os eventos se tornem obsoletos.

[00244] Em geral, os sinais elétricos originários do sistema de epi-iluminação 425 são convertidos em informação digital por um conversor do analógico para o digital 689 que supre a informação digital correspondente para o microprocessador 131. Em resposta à informação, o microprocessador 131 controla um sistema de separação 119 e um sistema de distribuição de fluido 15, ambos descritos acima.

[00245] Os sinais elétricos emitidos do fotodetector 117 do sistema de epi-iluminação 415 são sinais de tensão analógica de variação de tempo indicativos da amplitude da fluorescência emitida 31 em qualquer momento no tempo gerados por cada célula à medida que ela é iluminada pelo feixe de laser 25. Desse modo, os sinais analógicos (também denominados de saída analógica) se apresentam na forma de pulsos de forma de onda de variação de tempo 497, conforme ilustrado esquematicamente nas figuras 52 e 53. Em geral, um pulso de forma de onda 497 é definido como uma forma de onda ou uma porção de uma forma de onda contendo um ou mais pulsos ou alguma porção de um pulso. Assim, a amplitude de cada pulso de forma de onda 497 em qualquer momento no tempo representa a relativa taxa de emissão de fótons 31 de cada célula nesse instante no tempo em que a célula passa através do feixe de laser 25. As células de esperma bovino de cromossomo X apresentam um maior teor de DNA do que as células de esperma de esperma bovino de cromossomo Y (por

exemplo, de cerca de 3,8%). Como resultado, as células X vivas rotuladas com uma tinta fluorescente, conforme notado acima, irão produzir um pulso de forma de onda diferente 497 do que os pulsos de quaisquer outras células rotuladas. Com a análise dos pulsos 497, conforme notado abaixo (vide Processamento de Sinal, Varredura de Ranhura, e Diferença Crítica de Grau de Inclinação), cada célula pode ser identificada como uma célula X ou não identificada como uma célula X ($\sim X$). Em geral, conforme usado aqui, as células X referem-se a células X vivas, células Y referem-se a células Y vivas e células $\sim X$ referem-se à combinação de células Y vivas e células que de outra forma produzem uma emissão de fluorescência detectável 31, mas que não podem ser identificadas com uma probabilidade razoável como sendo células X vivas.

[00246] A sincronização de cada pulso de forma de onda 497 indica a posição de cada célula no fluxo 21. Uma vez que a taxa na qual o fluido de revestimento 19 está sendo dispensado através do bocal 137 permanece constante, e uma vez que a distância d (na figura 25) entre o bocal 137 e a localização de ruptura de partículas 107 é conhecida, a posição de cada gotícula 33 é conhecida, sendo conhecidas as células, caso haja alguma, dentro de cada gotícula 33. Desse modo, o microprocessador 131 pode calcular o momento no qual cada gotícula de formação passa através do colar de carregamento 631 e pode controlar a polaridade do colar 631 e assim controlar se uma gotícula 33 é carregada ou não para deflexão pelos elementos de carregamento 631 do sistema de separação 119. Uma vez que o microprocessador 131 conhece a taxa de formação de gotículas e identifica as células dentro de uma gotícula como X ou $\sim X$, o microprocessador 131 conhece o teor da célula de cada gotícula 33 e mantém o rastreamento (ou enumera) do número de células em cada população 123, 125. Dependendo da estratégia de separação, vide abaixo, o microprocessador 131

determina quais gotículas 33 são carregadas para deflexão e quais gotículas 33 não são carregadas, de modo que elas não sejam defletidas.

PROCESSAMENTO DE SINAL

A. Introdução de Amostragem Digital

[00247] Conforme anteriormente descrito, a interação entre o feixe de laser 25 e a partícula produz uma emissão de fótons "pulsados" 31 (por exemplo, uma emissão de fluorescência), que é capturada pela lente de coleta 511 do sistema óptico 109 e dispensada em um fotodetector 117. O fotodetector 117 converte a energia de fótons em qualquer momento no tempo em uma saída de tensão analógica de amplitude de variação de tempo. Esta saída é uma série de pulsos de forma de onda 497 (figuras 43 e 44) que contêm muitas características que podem ser usadas para discriminar entre as populações de partículas. Dentre estas características estão a emissão total de fótons, a taxa máxima de emissão de fótons durante o trânsito, a taxa média de emissão de fótons durante o trânsito, e o tempo exigido para o trânsito. A combinação de geometria de feixe de laser 459, tamanho de partícula, distribuição da fonte de emissão através do volume de partículas e da velocidade das partículas determina o espectro de frequência de pulsos de forma de onda 497. Para o sistema 1 usado com sêmen bovino descrito anteriormente, foi determinado que cada célula 201 produz um pulso de forma de onda 497 de entre 800 ns e 1200 ns de duração. Também foi determinado que, como uma função de frequência, mais de 97% da potência no pulso de forma de onda 497 são dispensados em frequências abaixo de 30 MHz. Este espectro de frequência será discutido posteriormente à medida que ele se refere ao teorema de amostragem Nyquist. Juntos, estes pulsos de forma de onda 497 formam um sinal de saída 701 originário do fotodetector 117 que é um sinal contínuo de variação de tempo que representa o trânsito do fluxo

de partículas através do aparelho. Além das características de pulsos individuais que são usados para discriminar entre as populações, o sinal de variação de tempo apresenta um registro preciso com relação ao relativo espaçamento (tempo e posição) entre as partículas individuais que passam através do aparelho e à relativa velocidade das partículas que se movem através do aparelho. Este registro preciso de tempo, de posição e de velocidade pode ser sincronizado com os sinais de relógio de geração de gotículas 703, conforme mostrado na figura 44, para determinar quais partículas são membros de uma gotícula específica 33 formada pelo aparelho de geração de gotículas 105. Esta informação pode ser usada como a base para a "coincidência" determinante ou a ocorrência de uma partícula desejada e indesejada em uma única gotícula 33. A capacidade para precisamente determinar o número e a classificação de cada partícula em uma gotícula 33 permite uma separação eficiente e precisa.

[00248] O processamento de sinal digital 705, conforme ilustrado na figura 72, pode ser empregado para analisar a detecção de pulsos de fluorescência 31, conforme indicado pelos sinais de saída sincronicamente amostrados 701 originários do fotodetector 117. Este processamento seria implementado em um software de análise de pulso que emprega instruções e/ou algoritmos, conforme indicado aqui. O sinal de saída analógico de variação de tempo 701 do fotodetector 117 é provido para um conversor AD (do analógico para o digital) 689 que sincronicamente o amostra. A amostragem sincrônica significa amostragem para produzir a informação digital que corresponde à saída analógica. A amostragem sincrônica é também denominada de amostragem contínua ou aquisição fluente. Conforme notado abaixo, a taxa de amostragem depende do espectro de frequência da saída analógica.

[00249] O conversor 689 supre uma saída incluindo informação di-

gital 707 que é provida para o microprocessador 131 ou outro dispositivo de análise digital que executa o software de análise de pulso para analisar a informação digital 707. Em geral, o software de análise de pulso incluiria a detecção de pulso digital HH3, a extração de característica de pulso HH4, e a discriminação de pulso HH7.

B. Frequência de Amostragem & Espectro de Frequência de Sinal

[00250] A saída de sinal 701 do PMT 117 é capturada por um conversor do analógico para o digital (ADC) de alta velocidade 689 que amostra a saída 701 continuamente em uma frequência de 105 MHz. É bem-entendido que quando da amostragem de um sinal de variação de tempo, é necessário que a frequência de amostragem seja pelo menos duas vezes a frequência máxima contida no sinal que é amostrado. Isto é conhecido como o teorema de amostragem Nyquist. Por esta razão, o sinal de saída 701 originário do PMT é enviado primeiro através de um filtro de passa-baixa de 40 MHz 854 (vide figura 39) para assegurar que a frequência máxima contida no sinal 701 esteja de acordo com o limite de 52,5 MHz imposto pela taxa de amostragem. É importante notar que o sistema óptico 109, o sistema fluídico 15 e o sistema de detecção do aparelho 1 foram sintonizados para produzir um pulso de forma de onda 497 apresentando ótimas características de frequência para amostragem na taxa de 105 MHz. A taxa de amostragem pode ser variada entre cerca de 25 e 200 MHz sem se afastar do escopo da presente invenção.

C. Processamento de Pulso

[00251] O processamento de pulso acontece em quatro (4) processadores DSP TigerSharc que compartilham de uma memória e que são conectados entre si por portas paralelas de alta velocidade. Conforme ilustrado na figura 39, os quatro processadores são: 1) um processador de gerenciamento de dados 863 que recebe dados de um conversor do analógico para o digital de alta velocidade 689 que digita-

liza os sinais de saída 701 originários do fotodetector 117; 2) um processador de detecção de pulso 865 que detecta os pulsos de forma de onda 497 representados pela informação digital; 3) um processador de extração e discriminação de características 867 que extrai características dos pulsos detectados 497 e discrimina os pulsos 497 com base nas características detectadas; e 4) um processador de separação 873 que determina uma classificação de separação para cada pulso 497 com base nas características extraídas e na discriminação e que determina decisões de separação para as células e gotículas 33 correspondentes, e que é sincronizado com a formação de gotículas 105. Em geral, um processador 863, 865, 867, 873 completa uma tarefa e ajusta um "sinalizador" de modo que os processadores associados saibam que há dados disponíveis para serem processados.

[00252] Cada processador 863, 865, 867, 873 funciona independentemente dos outros, maximizando todo o rendimento porque eles não se interrompem. Assim, qualquer processador 863, 865, 867, 873 pode ser capaz de executar qualquer função e um ou mais processadores ou funções podem ser combinados em um único processador ou dispersos sobre uma pluralidade de processadores. Os rótulos do processador 863, 865, 867, 873, conforme usados acima, e esta aplicação são usados para conveniência apenas e não se destinam a ser de maneira alguma limitativos.

[00253] Todos os quatro processadores 863, 865, 867, 873 são ligados a uma SDRAM de placa DSP 851 para trocar informação e são ligados a uma entrada/saída (I/O) de processador 857 para sincronização e comunicação com uma barra periférica de entrada/saída 859 conectada ao PC 735 e ao gerador de pulso de separação 861. O processador de entrada/saída 857 pode ser implementado por dois ou mais processadores de entrada/saída SharcFIN conectados a um elo de comunicação. Os sinais de separação 853 são supridos ao PC 735

através de uma barra periférica de entrada/saída 857 e são usados para controlarem o gerador de pulso de separação 861 que controla o carregamento de gotículas 33.

[00254] O processador de entrada/saída 857 recebe a saída 707 do conversor do analógico para o digital (ADC) 689, por exemplo, o Bitware Corp. 105MHz/2 canais, de 14 bits capaz de 105MHz/1 canal sustentado. O ADC 689 é conectado à saída do fotodetector 117 para converter seus sinais de saída analógicos de variação de tempo 701 em informação digital 707 e é também conectado a uma SDRAM de placa de entrada/saída 855 para armazenar os blocos de informação digital do ADC 689.

[00255] Em geral, os sinais de saída analógicos 701 originários do fotodetector 117 são indicativos da característica A ou característica B (por exemplo, X ou ~X). O conversor A/D 689 converte os sinais de saída analógicos 701 originários do fotodetector 117 do sistema de citometria de fluxo 1 em informação digital correspondente 707. Os processadores 863, 865, 867, 873 analisam e classificam a informação digital 707 e suprem um sinal de separação para o sistema de separação 119 como uma função da informação digital detectada e classificada.

D. Aquisição de Dados

[00256] Conforme anteriormente indicado, a saída de sinal 701 originária do fotodetector 117 é capturada por um conversor do analógico para o digital (ADC) de alta velocidade 689 que amostra a saída continuamente em uma frequência de 105 MHz. Os dados (informação digital 707) são transferidos imediatamente para os blocos de memória de alta velocidade (SDRAM da placa de entrada/saída) 855 que servem para armazenar temporariamente os dados de entrada. Estes blocos de memória 855 são organizados de maneira a manter a integridade e a seqüência do fluxo de dados 707. Estes blocos de memória 855 são

também acessíveis pelos processadores de processamento de sinal digital (DSP) 863, 865, 867, 873 pelo acesso direto de memória (DMA). Dessa maneira, os processadores 863, 865, 867, 873 podem acessar os dados de entrada 707 sem interromper o ADC 689. Isto facilita a transferência eficiente de dados 707 para estes processadores 863, 865, 867, 873 para a extração de característica, análise e classificação de separação. Por todo este processo, o processador de gerenciamento de dados 833 mantém as amostras de pulso 707 em ordem e indexadas por tempo (com relação ao relógio-mestre 737, que é 128 vezes a frequência da gotícula 33) para preservar sua referência ao "tempo real" ou o tempo efetivo em que a célula passou através do feixe de laser 25. O ADC 689 salta para trás e para frente entre duas entradas, continuamente amostrando os sinais de saída analógicos de variação de tempo 701 incluindo os pulsos de forma de onda 497 e os convertendo em informação digital 707 que é provida nos blocos 855 para a SDRAM da placa de entrada/saída sob o controle do processador de gerenciamento de dados 863. O processador 863 reúne a informação 707 em um fluxo contínuo.

E. Parâmetros de Detecção de Inicialização

[00257] A fim de eficazmente distinguir sobre o ruído de fundo, o software de detecção de pulso digital 747 deve ser provido com informação que indica estatística de segunda ordem de fundo de sinal, isto é, o conhecimento do comportamento do sinal de tensão de saída 701 originário do fotodetector 117 quando não houver qualquer pulso de fluorescência 497. Esta estatística pode ser aprendida pelo software para parâmetros de detecção de inicialização 741 em uma maneira não-supervisionada durante o período de inicialização imediatamente depois da partida do sistema 1. Em geral, um pulso pode ser definido como 2 ou 3 desvios padrão originários do nível de fundo.

[00258] Devido à possibilidade dessa introdução do fluido catalisa-

dor 17 no fluxo de fluido de revestimento 191 poder causar uma mudança na emissão de fluorescência de fundo, o fluido catalisador 17 deve estar presente para a inicialização dos parâmetros de detecção. A simples computação da estatística de segunda ordem de uma sequência de tempo dos valores de sinal de tensão de saída pode superestimar o desvio padrão do fundo (devido à possível presença de pulsos de fluorescência 497 na sequência). Um procedimento iterativo é, portanto, preferido para gradualmente eliminar este efeito. O software de detecção de pulso 747 consegue isto por meio da computação da estatística do sinal total 701 (fundo + pulsos), por meio do uso destes valores para aplicar a lógica de detecção de pulso, por meio da recomputação da estatística de sinal sem que amostras detectadas estejam dentro dos pulsos, e por meio da repetição deste procedimento até que as estimativas da estatística de fundo converjam (ou até que ocorra um número máximo fixado de iterações). Com a avaliação do fundo com as células presentes pode ser determinada uma indicação mais precisa da amplitude do pulso correto esperado 497. A Tabela II resume o procedimento de inicialização de detecção para determinar os parâmetros de detecção para uso pelo software de detecção de pulso.

Algoritmo: parâmetros de detecção de inicialização
Entrada: vetor de flutuações PMT volts; flutuação statWindowSize, maxiterações de número inteiro
Saída: flutuação bckgrndMean; flutuação bckgrndSTD
Procedimento: Inicializar vetor de fundo bckgrnd com relação às últimas amostras statWindowSize de vetor de PMTvols e numiterações, lastSampleMean, e lastSampleSTD em zero: $bckgrnd = PMTvols[1 \text{ to } statWindowSize]$ $lastSampleMean = 0$ $lastSampleSTD = 0$ $numIterations = 0$

2. Computar média de mostra e desvio padrão de amostra de bckgrnd e contador de interação de incremento

$$sampleMean = \frac{\text{sum}(bckgrnd)}{statWindowSize}$$

$$sampleSTD = \frac{\text{sum}(bckgrnd - sampleMean)^2)}{statWindowSize}$$

$$numIterations = numIterations + 1$$

3. Verificar convergência ou número máximo excedente de iterações:

$$exitFlag = ((sampleMean - lastSampleMean) < eps \wedge \\ (sampleStd - lastSampleStd < eps)) \vee \\ (numIterations > maxIterations)$$

Se exitFlag for verdadeira, seguir para a etapa 6 (senão, continuar com a etapa 4).

4. Aplicar algoritmo de detecção de pulso, obtendo vetores de amostras de pulso e nova estimativa de amostras de fundo:

$$[pulse, bckgrnd] = pulse\_detect(bckgrnd, sampleMean, sampleSTD)$$

5. Registrar estimativas de estatística a partir desta iteração e repetir

$$lastSampleMean = sampleMean$$

$$lastSampleSTD = sampleSTD$$

Ir para a etapa 2.

6. Ajustar estimativas de estatística de fundo à estatística de amostra e sair:

$$bckgrndMean = sampleMean$$

$$bckgrndSTD = sampleSTD$$

TABELA II. Inicialização de parâmetros de algoritmo de detecção de pulso

[00259] Em geral, o conversor do analógico para o digital 689 converte os sinais de saída analógicos 701 originários do fotodetector 117 em informação digital correspondente 707 indicativa de característica A ou característica B (por exemplo, X ou ~X). O processador de sinal digital 856 determina as características de fundo dos sinais de saída

de variação de tempo 701 a partir da informação digital 707 que corresponde aos mesmos, detecta os pulsos de forma de onda 497 a partir da informação digital 707 como uma função das características de fundo determinadas, e supre um sinal de separação 853 para o sistema de separação 119 como uma função dos pulsos detectados 497.

F. Parâmetros de Discriminação Iniciais

[00260] Similar aos parâmetros de detecção (e subseqüentes a sua inicialização, conforme mostrado na Tabela II), os parâmetros para uso em um algoritmo de discriminação podem ser inicializados em uma maneira não-supervisionada. Diferente dos parâmetros de algoritmo de detecção, entretanto, um procedimento iterativo não se faz necessário. Neste caso, o software para inicializar os parâmetros de discriminação 745 detecta um número preestabelecido (por exemplo, 100.000) de pulsos de fluorescência 497, computa as características a serem usadas para discriminação para cada pulso detectado 497, e usa um procedimento de agrupamento (vide Tabela II para um sumário dos procedimentos de agrupamento candidatos) para atribuir estes pulsos 497 às populações de interesse (por exemplo, X , $\sim X$).

Nome de Algoritmo	Abordagem de Algoritmo
Meio k	Minimização iterativa (local) da soma da distância elevada ao quadrado (Euclideana ou Mahalanobis) entre pontos dentro de cada população [1]
Meio k vago	Expectativa-Maximização de modelo de mistura (Gaussiano) [2]
Aglomerativo Hierárquico	Intercalação de grupos "mais próximos" (começando com cada ponto de dados como seu próprio grupo) até que o número desejado de grupos seja alcançado. Várias medições para determinação dos grupos "mais próximos" incluem a distância entre os pontos mais próximos, a distância entre os pontos mais distantes, a distância entre os meios de grupo, e a distância média entre os pontos [1]

TABELA 2. Sumário de abordagens de agrupamento que são consideradas para uso na inicialização de parâmetro de algoritmo de discriminação.

[00261] A figura 73 contém um exemplo dos resultados de aplicação de um procedimento de agrupamento de meio K para definir a população 1 e a população 2 com base nas estatística de distribuição. A estatística de segunda ordem destas populações são então usadas para o ajuste dos parâmetros necessários para discriminação (os coeficientes de uma função de decisão polinomial de 1^a e 2^a ordem). A

TABELA IV sumariza o procedimento de inicialização de discriminação.

Algoritmo: parâmetros de discriminação de inicialização
Entrada: matriz de flutuações detectedPulseData, vetor de flutuações pop-PriorProbabilities
Saída: para cada população de classe i ; matriz de flutuações W_i , vetor de flutuações W_i , flutuação W_{io}
Procedimento: Computar os valores de característica originários dos pulsos detectados (valores n por pulso, onde n é a dimensionalidade do espaço de característica): $featureValues = feature\_extract(detectedPulseData)$ 2. Agrupar valores de característica em espaço de característica para se obter as associações populações=grupo (Valores de característica) 3. Computar a estatística de 2^a ordem de populações: (para $i = 1$ a m, onde m é o número de populações/classes) (para $j = 1$ a n, onde n é a dimensionalidade do espaço de característica) $popMean_i[j] = \frac{\text{sum}(featureValues[populations_i, j])}{\# \text{ of samples in } populations_i}$ (para $k = 1$ para n, onde n é a dimensionalidade do espaço de característica) 4. Computar os coeficientes de função discriminante polinomiais: (para $i = 1$ a m, onde m é o número de populações/classes)

$$\begin{aligned}
 W_i &= -1/2 \cdot \text{popCovariance}_i^{-1} \\
 w_i &= \text{popCovariance}_i^{-1} \cdot \text{popMean}_i \\
 w_{io} &= -1/2 \cdot \ln(|\text{popCovariance}_i|) - \\
 &\quad 1/2 \cdot \text{popMean}_i^T \cdot \text{popCovariance}_i^{-1} \cdot \text{popMean}_i + \\
 &\quad \ln(\text{popPriorProbabilities}_i)
 \end{aligned}$$

TABELA IV. Inicialização dos parâmetros de algoritmo de discriminação.

[00262] Em geral, o conversor A/D 689 converte os sinais de saída analógicos 701 originários do fotodetector 117 em informação digital correspondente 707 indicativa da característica A ou característica B (por exemplo, X ou ~X). O processador de sinal digital 867 gera parâmetros de discriminação iniciais que correspondem à formação digital 707, discrimina a informação digital como uma função dos parâmetros de discriminação iniciais, e supre um sinal de separação 853 ao sistema de separação 119 como uma função da informação digital discriminada.

G. Detecção de Pulso Digital

[00263] A primeira etapa de processamento é a detecção de pulso executada pelo processador de detecção de pulso 865 para determinar se uma forma de onda específica é um pulso de forma de onda 497 que corresponde a uma emissão de fluorescência 31 de uma célula. O processador 865 executa um algoritmo de detecção de pulso que identifica os conjuntos de amostra que provavelmente representam ou partículas de alvo para separação em uma população, ou partículas alvo a serem evitadas porque elas são contaminantes potenciais para uma população. No caso de separação de esperma bovino, um corante é acrescentado para temperar a emissão 31 de células inviáveis, fazendo com que suas intensidades de pulso associadas sejam ~1/3 da intensidade de uma célula viva. As células inviáveis não são consi-

deradas como alvos de separação ou contaminação potencial. Elas não são consideradas pulsos detectados 497. Os pulsos 497 originários de células vivas são detectados com o monitoramento da intensidade de amostras para um número sucessivo de amostras que se elevam acima dos níveis de fundo. Uma vez que este nível cruza um limite estatisticamente determinado, o processador 865 pula para um tempo posterior que é aproximadamente de 75% da largura de pulso esperada 497 para uma célula viva. Se o nível estiver ainda acima do limite, a série de amostras será considerada como sendo um pulso 497. As amostras originárias dos pulsos detectados 497 são movidas para um bloco de memória usado pelo processador de extração de característica 867.

[00264] Uma abordagem de detecção de anomalia estatística é uma concretização que pode ser empregada pelo software de detecção de pulso digital 747, embora seja contemplado o possível uso de outras abordagens para identificar e/ou isolar pulsos digitalizados 497. Essencialmente, as amostras digitais 707 dos sinais de tensão de saída 701 originários do fotodetector 117 detectando a fluorescência que são estatisticamente anômalas a partir do fundo são consideradas parte de um pulso 497. Para robustez adicional (para minimizar as detecções de ruído), podem ser incluídos critérios temporais adicionais.

[00265] A detecção de pulso procede, como segue. Quando o sinal de saída de tensão 701 originário do fotodetector 117 não for um pulso, a distância de Mahalanobis do fundo de amostras de entrada 707 do sinal 701 será computada e comparada com um limite preestabelecido. Se a distância de uma determinada amostra exceder o limite, será considerado como sendo o início potencial de um pulso 497, e o software de detecção de pulso começará a armazenar temporariamente as amostras de entrada. Se o próximo número predeterminado de amostras (por exemplo, 25) também exceder o limite, um pulso 497

será considerado como tendo sido iniciado e o armazenamento temporário continuará até que os critérios de final de pulso sejam atendidos; de outra maneira, o armazenamento temporário será restabelecido e a verificação para o início de um pulso será resumida. Enquanto em um pulso 497, se uma amostra estiver abaixo do limite, então será considerado como sendo o fim potencial de um pulso e a localização de armazenamento temporário será registrada (embora o armazenamento de amostra continue). Se o próximo número predeterminado de amostras (por exemplo, 25) estiver também abaixo do limite, o pulso 497 será considerado como tendo sido finalizado e o pulso 497 consistirá Nas amostras amortecedoras até a localização registrada. A Tabela V sumariza o algoritmo de detecção de pulso, e a figura 49 propicia uma ilustração dos resultados da detecção de pulso em um pulso de fluorescência digitalmente adquirido 497.

Algoritmo: detecção de pulso de fluorescência digital
Entrada: vetor de flutuações <i>digSamples</i> , flutuação <i>bkgrndMean</i> , flutuação <i>bkgrndSigma</i> , flutuação <i>pulseSatarThresh</i> , flutuação <i>pulseEndThresh</i> , número inteiro <i>numStartSamples</i> , número inteiro <i>numEdnSamples</i>
Saída: vetor de flutuações <i>pulseBuffer</i>
Procedimento: Inicializar <i>inPulseFlag</i>=0, <i>pulseStartCount</i>=0, <i>pulseEndCount</i>=0 Para cada amostra em <i>digSample</i>, computar a distância de Mahalanobis a partir do fundo: $mhDist[i] = \frac{(digSample[i] - bkgrndMean)}{bkgrndSigma}$ 3. Se <i>inPulseFlag</i> não for ajustada, siga para a etapa 4, ou para a etapa 6. 4. Se <i>mhDist</i>><i>pulseStartThres</i>, colocar amostra em <i>pulseBuffer</i>, incrementar <i>pulseStartCount</i>, e seguir para a etapa 5; senão ajustar <i>pulseStartCount</i>=0, siga para a etapa 2. 5. Se <i>pulseStarCount</i>><i>numStartSamples</i>, ajustar <i>inPulseFlag</i>, ajustar e seguir para a etapa 2. 6. Se <i>mhDist</i><<i>pulseEndThresh</i>, colocar amostra em <i>pulseBuffer</i>, ajustar <i>lastPulseSample</i> na posição de armazenamento temporário de corrente, incrementar <i>pulseEndCount</i>, e seguir para a etapa 7; senão ajustar <i>pulseEndCount</i> em zero e seguir para a etapa 2.

7. Se pulseEndCount for maior do que numEndSamples, retornar pulseBuffer[1 para lastPulseSample] e sair.

TABELA V. Sumário da detecção de pulso de fluorescência digital.

[00266] Em geral, o conversor do analógico para o digital 689 converte os sinais de saída analógicos 701 originários do fotodetector 117 em informação digital correspondente 707 indicativa da característica A ou característica B (por exemplo, X ou $\sim X$). O processador de sinal digital 865 analisa a informação digital e o processador 873 supre um sinal de separação 853 para o sistema de separação 119 como uma função da informação digital detectada.

H. Extração e Discriminação de Característica

[00267] A próxima etapa de processamento é a extração de características executada pelo processador de extração e discriminação de característica 867. Este processador responde a sinalizadores ajustados pelo processador de detecção de pulso 865. As amostras originárias dos pulsos detectados são colocadas na memória compartilhada com o processador de extração de característica 867. Características, tais como a área, a largura de pulso, a altura de pulso, o coeficiente de correlação Gaussiano e/ou outras características, são determinadas para cada pulso 497. Em alguns casos, os pulsos 497 são determinados como sendo "dupletos" ou inválidos e as características não são extraídas. Para o caso de esperma bovino 201, as características são apenas extraídas para pulsos 497 que apresentam uma amplitude geral e largura de uma célula X ou Y viva. Tipicamente, a amplitude de pulso para uma célula de esperma vivo está na faixa de cerca de 700-900 mV, embora esta faixa possa ser tão larga quanto 500-1000 mV. Uma vez que as características são extraídas, elas são comparadas aos espaços de característica definidos para a(s) população(ções) selecionada(s) para separação. Se as características se casarem com os espaços de característica identificados para separação, então, o pro-

cessador 867 ajustará um sinalizador que indica um comando de separação positivo ao processador de separação 873. Em geral, a classificação de uma célula específica é feita pelo processador de discriminação 867 e a decisão de separação é feita pelo processador de separação 873.

[00268] A informação digital 707 que representa as emissões de fluorescência 31 (e, portanto, as características de células correspondentes que as criaram) é discriminada pelo software 757 com base nas características específicas ou características que exibem um comportamento estatístico distinguivelmente diferente no *espaço de característica* (o espaço ortogonal dimensional n formado pelas características n como os eixos) para as diferentes populações de interesse. Por isso, a primeira etapa na análise da informação digital 707 para fins de discriminação é a computação destas características, um processo denominado de *extração de característica* executado pelo software de análise de pulso 749 executado pelo processador 867. A Tabela VI lista as diversas características candidatas que o software 749 pode usar para esta aplicação. Uma ou mais destas características serão selecionadas para a formação do espaço de característica para classificação. Deve ser notado que há características adicionais que proporcionam uma separação intensificada, de modo que esta lista seja exemplificativa, e não compreensiva. Por exemplo, o software 749 pode empregar uma sub-rotina 753 para determinar a área de pulso 497 e/ou pode empregar uma sub-rotina 755 para determinar o pico do pulso 497.

1. Nome da Característica	2. Descrição da Característica
área do pulso	aproximada pela soma (ou média) das amostras de pulso
pico do pulso	valor máximo das amostras de pulso
área "interna" do pulso	soma (ou média) das amostras TBD internas de pulso (centralizadas na média de pulso)
largura do pulso	Número de amostras no pulso.

1. Nome da Característica	2. Descrição da Característica
"gaussianidade" do pulso	MSE ou coeficiente de correlação de pulso com uma forma Gaussiana com a mesma estatística de 2ª ordem
"pico de retardamento" do pulso	valor de pulso nas amostras TBD além do pico (ou média)
diferença crítica do grau de inclinação (CSD)	grau de inclinação de pulso em um ponto ao longo do pulso no qual a diferença entre o primeiro derivativo de um pulso produzido pelas partículas apresentando a característica A e o primeiro derivativo de um pulso produzido pelas partículas apresentando a característica B está em um máximo ou próximo deste

TABELA VI. Sumário das características candidatas que são atualmente consideradas para uso na análise de pulso digital referente à extração de característica.

I. Varredura de Ranhura

[00269] Em geral, a fenda elíptica 459 provida pelo sistema de iluminação 109 mede as relativas diferenças de teor de DNA nas células. A resolução pode ser aperfeiçoada adicionalmente pela análise da fração do pulso 497 da emissão de fluorescência 31 detectada pelo fotodetector 117 mais provavelmente para conter as características que estão sendo avaliadas. Um fenômeno biológico de certas células (por exemplo, células de esperma bovino) é a localização dos cromossomos X/Y em uma região subequatorial 225 que está imediatamente adjacente à linha intermediária longitudinal ou equador ou centro do núcleo 213 da célula 201 e que apresenta um comprimento de cerca de 1 μm (vide figura 6). De fato, os cromossomos X/Y não são necessariamente centralizados no núcleo 213. Portanto, a resolução pode ser aperfeiçoada com a conversão da saída analógica de variação de tempo 701 do fotodetector 117 em informação digital 707 e com a análise de uma porção da informação digital que corresponde à fração do pulso 497 da emissão de fluorescência 31, por exemplo, correspondendo à luz emitida a partir da região circun-equatorial 225, tal como

20-60% e particularmente 20-30% do pulso de forma de onda centralizado em torno do pico do pulso 497.

[00270] Conforme notado acima, a varredura de ranhura pode ser empregada para se obter a medição de fluorescência a partir de uma porção de cada cromatina da célula do que da cromatina como um todo. O ponto elíptico 459 provido pelo sistema de epi-iluminação 415 notado acima mede as relativas diferenças de teor de DNA nas células a partir de seções específicas da cromatina, de modo que a resolução das células X e das células ~X entre si seja aperfeiçoada. Conforme notado acima, a técnica de medição de varredura de ranhura é uma abordagem de medição de fluorescência que focaliza o feixe de excitação 25, de modo que uma dimensão do tamanho de ponto focalizado 459 seja menor do que um diâmetro de célula, conforme mostrado na figura 6. Desta maneira, a célula 201 é varrida pelo feixe de laser 25 à medida que a célula passa através do ponto de feixe elipticamente formado 459. O pulso de forma de onda resultante 497 produzido pela saída 701 do fotodetector 117 que detecta a emissão de fluorescência 31 resultante da iluminação de varredura de ranhura contém a informação a cerca da localização da fluorescência ao longo do comprimento da célula 201. Conforme mostrado nas figura 45-48, à medida que a célula 201 atravessa o ponto de feixe elipticamente formado 459, os pulsos de forma de onda de variação de tempo 497 (linha vermelha/laranja) são a convolução da relativa intensidade do feixe (linha azul) e a relativa intensidade de pulso emitido (que corresponde às emissões de fluorescência originárias do tingimento excitadas pelo ponto elíptico à medida que a célula atravessa o feixe e que varia porque a distribuição de fluorescência ao longo do eixo da célula varia).

[00271] Com a iluminação de apenas uma fração da cromatina da célula de uma vez, a saída analógica de variação de tempo resultante 701 do fotodetector 117 contém a informação específica à localização

da fluorescência dentro da cromatina ao longo do eixo longitudinal da célula 201. Embora a emissão de fluorescência detectada 31 da varredura de ranhura seja menor do que a emissão detectada 31 da varredura por um feixe 25 apresentando uma largura de ponto comparável ao diâmetro da célula, resultando em pulsos de forma de onda 497 da varredura de ranhura apresentando uma amplitude de pulso menor, a maior parte da diferença entre as células conduzindo cromossomos X e das células conduzindo cromossomos Y aparece no centro de 20-30% a 20-60% do pulso de forma de onda 497. Se apenas a área retangular 725 na figura 53 for considerada para discriminação das células de esperma X-Y, então, uma maior diferença relativa poderá ser medida entre a variação localizada no teor de DNA dentro da seção de cromatina que corresponde à região retangular 725 devido à presença dos cromossomos X e Y dentro dessa região, conforme comparado ao teor total de DNA das células. Por exemplo, as células de esperma bovino X-Y apresentam uma diferença no teor total de DNA de cerca de 3,8%. A emissão de fluorescência 31 dos cromossomos X e Y ficará contida na região retangular 725. Se esta região retangular 725 considerar 20% do pulso de forma de onda total 497 correspondendo a uma emissão de fluorescência 31, então, uma diferença de 14% em relação ao teor de DNA dentro da região irá existir. Com a medição das relativas diferenças de teor de DNA originárias das seções específicas da cromatina, a resolução da diferenciação de célula de esperma X-Y é aperfeiçoada (por exemplo, de 3,8% a 14%). A figura 54 ilustra a resolução obtida com o uso de iluminação de varredura de ranhura e de processamento das áreas a partir apenas do centro de 20% do pulso 497 (isto é, a região retangular 725 da figura 53). O histograma da figura 54 permite que uma porcentagem muito alta (por exemplo, 98%) do esperma conduzindo cromossomos X e do esperma conduzindo cromossomos Y seja identificada com um alto grau de confiança (por

exemplo, 95%). Em comparação, o histograma da figura 55, que ilustra a resolução obtida quando do uso de técnicas de iluminação padrão, mostra que a varredura de ranhura oferece um aperfeiçoamento significativo sobre os resultados obtidos com o uso de técnicas de iluminação padrão.

[00272] Duas abordagens que podem ser empregadas para se obter a área 725 da porção central do pulso de forma de onda 497, conforme ilustrado na figura 53, são o processamento de sinal digital (DSP) da saída analógica de variação de tempo 701 digitalizada do fotodetector 117, conforme discutido nesta seção, ou a integração analógica que usa um disparador de limite analógico, conforme notado abaixo. Conforme notado aqui, o processamento DSP envolve a amostragem contínua da saída analógica de variação de tempo 701 originária do fotodetector 117 para se obter a informação digital 707 que corresponde à saída 701 e a aplicação de algoritmos DSP à informação digital 707 para extrair características, tal como o tamanho da área, da informação digital correspondente à porção central 725 do pulso de forma de onda 497 que corresponde à diferença no teor de DNA devido à presença de um cromossomo X ou Y em diferentes células 201. Como um simples exemplo, os 20% centrais da área total de cada pulso de forma de onda 497 seriam determinados com a análise da informação digital 707 correspondente aos mesmos. A análise seria usada para gerar um histograma, conforme ilustrado na figura 53.

J. Varredura a Laser Pulsado

[00273] Em uma concretização, é contemplado que o sistema 1 inclua um laser pulsado para iluminar as células. Nesta concretização, a varredura de ranhura (conforme descrito) pode ou não ser empregada. Por exemplo, um laser de estado sólido travado por modo pode ser usado para emitir um trem de pulsos eletromagnéticos apresentando uma largura (duração) de pulso de 1-100 picossegundos em uma fre-

qüência de pulso de cerca de 50-150 MHz e em uma saída de potência média de cerca de 100-500 miliwatts. Um laser adequado é um laser de estado sólido travado por modo Vanguard 350 (disponível pela Spectra-Physics, Mountain View, CA 94039), que é operável para emitir uma série de pulsos de cerca de 12 picossegundos de largura (duração) em uma frequência de cerca de 85 milhões de pulsos por segundo e em uma potência média de cerca de 350 miliwatts. Devido ao fato de 350 mV de potência serem distribuídos sobre estouros extremamente pequenos de apenas 12 picossegundos, a saída de potência de pico de tal laser é diversas centenas de vezes (por exemplo, de cerca de 800 vezes) maior do que a potência média.

[00274] A saída de tal laser pode ser descrita como onda quase contínua (quasi-cw) porque, para muitas aplicações, a taxa de repetição de pulso é rápida o suficiente para aproximar uma saída de onda contínua (cw). Certamente, é possível operar o sistema, conforme descrito acima, com um laser de onda quase contínua em muito da mesma maneira como operaria com um laser de onda contínua. Isto confere certas vantagens porque os lasers de estado sólido tipicamente operam mais eficientemente, exigem sistemas de resfriamento menos prolongados, e exigem menos manutenção do que a maioria de outros lasers.

[00275] Um laser de estado sólido pulsado de onda quase contínua pode também resultar em relações de sinal-ruído significativamente aperfeiçoadas com uso das técnicas de processamento de sinal digital. Um circuito de sincronização pode ser incluído e é operável para produzir um sinal de sincronização indicativo da chegada de pulsos de laser na localização de interrogação 115 (isto é, a área onde o feixe de laser 25 ilumina o fluxo 21). Por exemplo, o circuito de sincronização pode ser um sensor de pulso de laser 3003, conforme mostrado na figura 40, para detectar luz correspondente ao pulso de laser incluindo

luz dispersa gerada pela interação de cada pulso de laser com o fluxo de fluido 21 e/ou incluindo luz originária dos pulsos de laser. Alternativamente, para lasers que podem ser disparados, um sinal de disparo pode ser provido ao microprocessador 131 e/ou ao conversor A/D 689 para sincronizar cada pulso ou ambos os pulsos de laser, conforme notado abaixo com relação à figura 50. Em cada concretização, a sincronização de pulso de laser proveria um sinal de relógio para o sistema.

[00276] Com referência à figura 50, um diagrama de sincronização ilustra a relação de sincronização entre os pulsos de laser LP, as emissões de fluorescência FE de uma célula como resultado da excitação repetida pelos pulsos de laser LP à medida que a célula passa através do ponto de feixe 459 e das amostras digitais DS da saída de fotodetector 701. Conforme mostrado, nas figuras 45-49, à medida que uma célula passa através do ponto de feixe de laser 459, a emissão de fluorescência 31 varia dependendo da quantidade de iluminação da porção da célula que gera a emissão de fluorescência 31. A figura 50 ilustra vinte (20) pulsos de laser LP1-LP20 que incidem sobre uma célula à medida que a célula passa através da zona de interrogação 115 de um citômetro de fluxo 1. Cada pulso de laser LP1-LP20 corresponde a uma emissão de fluorescência FE1-FE20, respectivamente, que exponencialmente sofre uma queda depois da excitação substancialmente instantânea pelo pulso de laser.

[00277] Em uma concretização, o microprocessador 131 controla o conversor do analógico para o digital 689 (vide a figura 40), de modo que o conversor 689 amostra o sinal de saída 701 do fotodetector 117 no pico de cada emissão de fluorescência FE1-FE20 ou próximo deste, conforme indicado pelas amostras digitais DS1-DS20, respectivamente. Em outras palavras, o circuito de sincronização sincroniza a taxa de amostragem do conversor do analógico para o digital 689 com

as emissões de fluorescência FE1-FE20. O sinal digital resultante produzido pelo trânsito de uma partícula através da zona de interrogação 115 é o equivalente funcional do sinal digital que teria sido produzido pela digitalização de uma forma de onda de pulso 497 de um laser de onda contínua. Conforme mostrado na figura 51, por exemplo, com a consideração de apenas a intensidade de fluorescência durante as amostras digitais DS1-DS20 e a desconsideração do declive acentuado da intensidade de fluorescência entre os pulsos de laser LP1-LP20, a intensidade de fluorescência como uma função do tempo é uma forma de onda de pulso 497. Isto permite a extração de característica pelo microprocessador 131 do sinal digital 707 gerado pelo laser pulsado a fim de analisar a célula provendo as emissões de fluorescência FE1-FE20. Em uma concretização, um fotodetector mais sensível apresentando um tempo de resposta relativamente rápido de cerca de 2 nanossegundos ou menos pode ser usado para detectar com uma maior precisão as emissões de fluorescência.

[00278] Desse modo, o laser pulsado apresenta vantagens em um sistema de citometria de fluxo 1 em que é possível usar um laser pulsado de potência mais baixa para se obter substancialmente a mesma análise que seria obtida com um laser de onda contínua que opera em uma potência média muito mais alta que a potência média do laser pulsado. Adicionalmente, a potência de pico alta de um laser pulsado tende a saturar os fluoróforos, de modo que as emissões de fluorescência sejam maximizadas, reduzindo assim a relação de sinal-ruído dos sinais de saída do fotodetector. Em outras palavras, com o uso de um pulso de laser que contém muito mais energia do que é exigido para saturar o fluoróforo, variações na saída do laser não resultam em variações nas emissões de fluorescência 31.

[00279] Aqueles versados na técnica irão reconhecer que há diversas maneiras de se fazer com que um laser emita uma série de pul-

sos. É entendido que outros lasers pulsados, incluindo lasers travados por modo, lasers comutados Q, e lasers de despejo em cavidade, poderiam ser usados no lugar do laser travado por modo discutido acima sem se afastar do escopo desta invenção. Similarmente, muitas outras maneiras para sincronizar a amostragem digital e processar a informação resultante se tornarão evidentes a partir da descrição anterior. Por exemplo, a amostragem digital poderia ser sincronizada, de modo que haja um retardamento diferente (ou não retardamento) entre um pulso de laser e uma amostra digital sem se afastar do escopo da invenção. Igualmente, o número de amostras digitais por pulso ou o número de pulsos que decorrem entre a amostragem digital pode ser também variado sem se afastar do escopo desta invenção.

K. Estimativa de Características de População

[00280] Conforme notado acima, a citometria de fluxo pode ser usada para discriminar as células de esperma bovino conduzindo cromossomos X das células de esperma bovino conduzindo cromossomos Y com base em sua relativa diferença de 3,8% no teor de DNA. A discriminação é conseguida através da análise das características do sinal de variação de tempo 701 que é produzido pelo fotodetector 117 usado para registrar a emissão de fluorescência 31 à medida que a célula tingida passa através da localização de interrogação 115. Esta interação é ilustrada nas figuras 45-48. As figuras 45-48 ilustram como uma forma de onda de pulso 497 é gerada pelas emissões de fluorescência 31 resultantes da interação entre o feixe de laser 25 e uma célula de esperma tingida 201. O pulso de emissão 497 é a convolução integral da função espacial de excitação 498 e a função espacial de emissão da célula 201. Características da forma de onda de pulso de fluorescência 497 são usadas para classificarem uma célula como X, Y ou indeterminada. Em uma concretização, a discriminação X-Y conta com duas características de pulso: altura do pulso de pico e área do

pulso.

[00281] Estas características são ilustradas no pulso de exemplo que aparece nas figuras 52 e 53. As figuras 52 e 53 são exemplos de pulsos 497 das células de esperma conduzindo cromossomos X e conduzindo cromossomos Y. Os pulsos 497 foram gerados a partir de um modelo de computador que assumiu a iluminação de excitação com um feixe de laser 25 apresentando um ponto de feixe elipticamente formado 459 apresentando um estreitamento de feixe Gaussiano de $2\ \mu\text{m}$ W1 (figura 6) e que a diferença de teor de DNA foi distribuída uniformemente através do centro de 20 por cento da célula 201. Estas suposições são representativas da iluminação de varredura de ranhura de células de esperma bovino 201 apresentando uma diferença de DNA localizada, conforme discutido em maiores detalhes acima. A integração dos pulsos 497 resulta em uma diferença média de 3,8% entre a área do pulso 497 para uma célula X e a área do pulso 497 para uma célula Y.

[00282] É possível gerar gráficos de dispersão e histograma das características de pico e de área do pulso 497 para células e núcleos tingidos. As figuras 56-59 contêm histogramas da característica de área de pulso para núcleos tingidos e células vivas, mais gráficos de dispersão das características de pico e de área do pulso 497 para núcleos tingidos e células vivas. Alguns dos itens que podem limitar a discriminação de célula viva, e basicamente a taxa de separação de célula, estão evidentes nestes gráficos. Notavelmente, o histograma de célula viva da figura 57, e, em uma menor proporção, o histograma de núcleos da figura 56, apresentam uma projeção esquerda que é típica dos histogramas de intensidade de fluorescência para células de esperma de mamíferos. Foi determinado que a projeção esquerda é gerada por uma ou mais populações de células ligeiramente desalinhadas (isto é, células que geram emissões de fluorescência relativa-

mente mais fracas devido aos ligeiros desvios do ótimo alinhamento, mas que não estão assim tão fora de alinhamento para fazer com que a emissão de fluorescência relativamente mais clara 31 da borda estreita 209 da cabeça do esperma 205 seja coletada pelo sistema óptico 109). Apenas metade das células X pode ser facilmente identificada no histograma da área de célula viva. O resto é sobreposto com a população de célula Y e as populações de célula não-alinhadas. Mesmo quando a altura do pulso de pico for acrescentada, conforme mostrado nos traçados de dispersão nas figuras 56-59, a classificação de célula conduzindo cromossomos X poderá ser significativamente limitada.

[00283] As figuras 60-61 ilustram a sobreposição das distribuições de população X e Y. Nas figuras 60-61, um modelo de computador de quatro componentes foi aplicado aos dados brutos 6000 (figura 60) para estimar a estatística de população para duas populações de células não-alinhadas (6001, 6003), células Y vivas alinhadas (6005) e células X vivas alinhadas (6007) (figura 61). É desejável discriminar as populações X e Y como uma função do coeficiente de variação (CV) das populações X e Y. Por exemplo, é desejável minimizar o coeficiente de variação (CV) das populações X e Y a fim de aperfeiçoar a discriminação. Em particular, quando uma população de células X separadas for desejada, será desejável que a CV da população de célula X seja menor que 1,5%, mais desejavelmente de cerca de 1,3%, e ainda mais desejavelmente menor do que 1,3%. Tradicionalmente, o CV de uma distribuição de intensidade de fluorescência de células de esperma foi considerado com relação às funções de distribuição para apenas duas populações (X e Y). O controle de qualidade com relação ao CV foi limitado à estimativa subjetiva bruta do CV das populações X e Y para decidir se a análise ou a separação continuada vale a pena.

[00284] De acordo com uma concretização da presente invenção, uma função do microprocessador 131 é a de prover uma estimativa

automatizada do CV da população com o uso do modelo de quatro componentes ilustrado nas figuras 60-61. A fim de estimar os CVs das populações presentes em uma distribuição de características (por exemplo, a área do pulso), é necessário estimar a estatística de 2ª ordem das distribuições de população. Isto pode ser alcançado com a aplicação de um modelo de uma forma conhecida e a descoberta do melhor ajuste desse modelo aos dados observados.

[00285] Dada a expectativa dos dados normalmente distribuídos, foi escolhida uma abordagem consistindo em estimativa de densidade não-paramétrica com base em Parzen Window (utilizando uma função de núcleo Gaussiano) seguida pela aplicação de um modelo paramétrico de mistura Gaussiano. Especificamente, o modelo de quatro componentes ilustrado nas figuras 60-61 consiste em uma soma (ou mistura) de quatro distribuições Gaussianas de uma variável estatística, com estes quatro componentes sendo as distribuições de característica correspondendo às células X alinhadas, às células Y alinhadas, e a uma população de células desalinhadas de dois componentes. Os parâmetros que caracterizam o modelo são então as médias de população (médias)(4), as variações/desvios padrão de população (4), e as probabilidades anteriores (% esperado da distribuição total) (4). Estes 12 parâmetros podem ser então variados para se alcançar um melhor ajuste do modelo com relação ao histograma de dados observados. Com os parâmetros de componente de modelo assim estimados, uma estimativa do CV de uma população de interesse (em particular, células X) pode ser determinada a partir do desvio e da média padrão de população estimada:

$$CV = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \cdot 100\%$$

[00286] A fim de reduzir a complexidade computacional, foram impostas restrições ao modelo para reduzir a dimensionalidade do espaço de parâmetro. Em particular, os desvios padrão dos componentes

de modelo correspondentes às populações de X alinhadas e de Y alinhadas foram limitados para serem os mesmos. Também, os componentes de X alinhados e Y alinhados foram limitados para formarem a mesma porcentagem de toda a mistura - portanto, as populações não-alinhadas são assumidas como 50% de células X e 50% de células Y.

[00287] A estimativa de densidade não-paramétrica é aplicada antes do ajuste do modelo para se obter uma melhor estimativa da função de densidade total (sendo a soma das densidades de componentes) que é essencial aos dados brutos do histograma. A técnica específica aplicada é conhecida como "Parzen Windows" (Duda, Hart, and Stork, 2001), aqui utilizando uma função de janela ou núcleo Gaussiano devido à soma assumida de natureza Gaussiana da densidade essencial. O desvio padrão do núcleo Gaussiano é escolhido para ser 1% do número de receptáculos de histograma povoados; este valor foi empiricamente observado para prover uma regularização adequada mas não excessiva do histograma. Cada ponto de dados no histograma contribui então como uma função de núcleo centralizada no receptáculo de histograma contendo o ponto de dados. A estimativa de densidade é então obtida como a soma das funções de núcleo.

[00288] A metodologia escolhida para variação dos parâmetros de modelo para se conseguir o melhor ajuste aos dados é conhecida como Maximização de Expectativa (vide, Duda R.O., Hart, P.E., e Stork, D.G., 2001, *Pattern Classification 2ª Ed.*, John Wiley & Sons; e Moore, A., "Verry Fast em-based Mixture Model Clustering using Multiresolution kd-trees", em M. Kearns e D. Cohn, Eds., *Advances in Neural Information Processing Systems*, páginas 543-549, 1999, Morgan Kaufman). A implementação algorítmica específica utilizada é a seguinte:

[00289] 1) Condições iniciais para os parâmetros de modelo são estabelecidas. As duas máximas locais superiores na estimativa de

densidade Parsen são usadas como as localizações iniciais médias Y e X (a amplitude inicial da máxima tanto para a população X como para a população Y sendo estimada como a amplitude do pico direito). A variação inicial de população X e Y é estimada como a variação dos dados à direita do local mínimo que ocorre entre os picos esquerdo e direito relativos à localização de pico direito. Também, a população inicial X e Y antes das probabilidades é ajustada como a porcentagem de todos os pontos que estão à direita deste local mínimo. As estimativas de densidade Gaussiana iniciais de população X e Y são então computadas com o uso destes parâmetros e subtraídas da estimativa de densidade Parzen total. A média e a variação dos pontos de dados restantes são então computadas e usadas para inicializar a população desalinhada de dois componentes, como segue. As duas médias de população são assumidas (arbitrariamente) para ficarem afastadas entre si a 5% (2,5% acima e abaixo de toda a média desalinhada). Dada uma suposição (inicial) de acontecimentos anteriores iguais e variações iguais, então, as variações de componente são fornecidas por:

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

[00290] onde σ^2 é a variação e μ é a média da respectiva população.

[00291] 2) Estimativas atualizadas da estatística de população de componente (média, desvios padrão, e acontecimentos anteriores) são computadas com o uso da estimativa de densidade Parzen. Cada localização de receptáculo de histograma é ponderado nas computações estatísticas pela estimativa de densidade Parzen nesse receptáculo. Adicionalmente, cada ponto de dados contribui para todas as computações de estatística de população de componentes ponderadas pelo grau com relação ao qual acredita-se pertencer esse ponto em uma determinada população, com base nos parâmetros de população de componente comum. Este grau de associação é determinado

como a proporção de um valor de densidade de probabilidade (Gaussiano) de uma determinada população de componentes com relação à soma de todos os valores de densidade de probabilidade de população de componentes no ponto de dados. Assim, são apresentadas as associações de componentes de população (para todos os pontos de dados x no histograma, populações $c_p \in \{c_x, c_y, c_u\}$, e vetor de parâmetro de população $\theta_p = [\mu_p, \sigma_p, P_p]$) usadas na computação de estimativas de parâmetro atualizadas fornecidas por:

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

$$\text{associação } x, \theta_p = \frac{P(c_p | x, \theta_p)}{\sum_{n \neq p} P(c_n | x, \theta_n)} \frac{\text{Estimativa de Densidade}}{\text{Parzen}(x)}$$

[00292] Médias e variações atualizadas são então computadas com o uso de valores de estimativa de densidade Parzen ponderados por estes valores de associação, com acontecimentos anteriores atualizados fornecidos pela associação média para cada população de componentes sobre todos os pontos de dados.

[00293] 3) O procedimento de atualização de parâmetro continua até que todos os parâmetros alcancem o regime estável (isto é, parem de mudar significativamente de uma iteração de atualização para a próxima (ou até que ocorra um número máximo permitido de iterações)).

[00294] Conforme mencionado anteriormente, as populações de X e Y são limitadas neste procedimento para terem a mesma variação e probabilidade anterior. Esta limitação é alcançada com o uso da média da variação de X e Y e valores anteriores computados através do procedimento acima em cada iteração.

[00295] Alternativamente, uma abordagem de modelagem similar pode ser aplicada a um modelo de três componentes (figuras 62-63) no qual as células compreendendo as duas populações desalinhadas

6001, 6003 no modelo de quatro componentes são tratadas como uma única distribuição Gaussiana 6011 do que as duas subpopulações distintas. As células não-alinhadas podem ser modeladas como terceira distribuição Gaussiana (mostrado na figura 63) apresentando um desvio médio e padrão determinado pelo melhor ajuste da projeção esquerda e pico principal esquerdo dos dados brutos 6010 (mostrados na figura 62). O modelo de três populações também apresenta estatística estimada para a população Y alinhada 6015 e a população Y alinhada 6017. Uma vantagem do modelo de três componentes é a de que ele exige apenas um espaço de parâmetro 9-dimensional (comparado ao espaço de parâmetro 12-dimensional exigido para o modelo de quatro componentes). Entretanto, foi descoberto que o modelo de quatro componentes tipicamente resulta em uma função de densidade estimada que corresponde mais rigorosamente com os dados brutos.

[00296] Aqueles versados na técnica irão reconhecer que uma ampla variedade de técnicas estatísticas pode ser usada para estimar as características das populações X e Y alinhadas. Desse modo, o modelo de quatro componentes, o modelo de três componentes, ou outros modelos podem ser implementados por quaisquer algoritmos de computador paramétricos ou não-paramétricos para estimar as características das populações de células X alinhadas e populações de célula Y alinhadas sem se afastar do escopo desta invenção.

L. Seleção com Base em CV de Condições de Tingimento

[00297] Diversos fatores afetam a eficiência de separação de células tingidas dentro de uma população em subpopulações enriquecidas de células. Dentre estes fatores está a quantidade de fluorescência diferencial entre as várias subpopulações de células dentro de uma população tingida. A fluorescência diferencial é afetada pela absorção de corante, que varia com base nos fatores de tingimento, tais como, por exemplo, a concentração da coloração, a duração do período de

tingimento, a temperatura na qual o tingimento ocorre, e o número e a concentração de quaisquer aditivos que possam ser incluídos com a coloração ou acrescentados à mistura de tingimento. Conseqüentemente, os ajustes a qualquer ou a todos estes fatores podem ser feitos para aumentar a eficiência de separação (a taxa na qual as células podem ser separadas em pelo menos uma subpopulação enriquecida de células com certo grau de pureza e/ou uma perda mínima de células desejadas) da população de células tingidas. Adicionalmente, pode-se aumentar a eficiência de um sistema de separação de múltiplas amostras com o ajuste de um ou mais destes fatores para cada amostra, neutralizando assim quaisquer variações de amostra para amostra. No contexto de separação de esperma bovino, por exemplo, a eficiência de separação pode ser aperfeiçoada com o ajuste de um ou mais fatores de tingimento anteriores de uma amostra de sêmen para a próxima para neutralizar as variações de touro para touro ou variações de amostra para amostra dentro do mesmo touro.

[00298] Uma determinação do coeficiente de variação ("CV") para uma determinada característica de emissão de fluorescência de uma população de células a ser separada é uma maneira na qual se determina se os ajustes às condições de tingimento poderiam ser feitos para se atingir uma eficiência de separação desejada. Por exemplo, pode-se ajustar as condições de tingimento como uma função do CV de qualquer característica extraída da forma de onda de pulso gerada pelo movimento de uma célula através da localização de interrogação, tal como qualquer característica indicativa da intensidade de fluorescência total ou intensidade de fluorescência de pico (incluindo a intensidade de fluorescência total e a intensidade de fluorescência de pico). Conforme discutido anteriormente em maiores detalhes, o CV é um indicador da homogeneidade ou consistência de uma distribuição de uma propriedade ou característica mensurável de uma subpopulação

de uma determinada população. O CV pode ser determinado com a divisão do desvio padrão da característica medida de uma amostra pela média da amostra. O CV pode também ser determinado automaticamente pelo sistema de citometria de fluxo 9, tal como pela implementação do algoritmo de estimativa CV iterativo discutido em detalhes acima. Quanto menor o CV, maior a homogeneidade ou a consistência da distribuição da característica medida.

[00299] Conforme aplicado ao tingimento e à separação das células de esperma, o CV de uma característica de emissão de fluorescência específica para uma amostra de células de esperma conduzindo cromossomos X e Y pode ser afetado pelas condições de tingimento. A concentração da coloração, a duração do período de tingimento, a temperatura da mistura de tingimento, e/ou o número e a concentração de aditivos afetam o CV de uma determinada característica de emissão de fluorescência. O aumento da concentração da coloração, a duração do período de tingimento, e a temperatura da mistura de tingimento e/ou o decréscimo do número e da concentração de aditivos irão geralmente abaixar o CV. Tais condições podem ser alteradas individualmente ou em combinação. Além disso, se qualquer destes fatores for tal que tenda a aumentar o CV de uma característica de emissão de fluorescência, tal como, por exemplo, com o encurtamento do tempo de tingimento, então, qualquer uma ou mais das outras condições poderão ser ajustadas, de tal modo que elas neutralize o efeito da primeira, tal como, por exemplo, com o aumento da concentração de corante, com o resultado total sendo um decréscimo no CV da característica de emissão de fluorescência a um nível suficiente para se alcançar uma eficiência de separação desejada. Conseqüentemente, com a manipulação de qualquer fator ou de qualquer combinação destes fatores, o CV de uma característica de emissão de fluorescência de populações conduzindo cromossomos X e Y pode ser diminuído

para um valor que permita a separação da amostra de esperma em uma subpopulação de sêmen enriquecido de gênero que compreende uma pureza de porcentagem desejada de células conduzindo cromossomos X.

[00300] Infelizmente, mudanças que tendem a abaixar o CV do esperma conduzindo cromossomos X podem ter conseqüências negativas, tal como o custo aumentado ou a motilidade ou a fertilidade diminuída do esperma. Por exemplo, com outras coisas sendo iguais, é desejável usar concentrações de coloração inferiores e períodos de tingimento mais curtos para minimizar qualquer impacto nocivo do processo de tingimento sobre o esperma. Com isto em mente, pode-se predeterminar um CV no qual uma eficiência de separação aceitável será alcançada. Depois disso, uma fração da amostra de célula a ser classificada é tingida e submetida à análise de citometria de fluxo. Uma característica de emissão de fluorescência da fração é determinada, e a fração é classificada em subpopulações com base na característica. O CV da característica de fluorescência é determinada com relação às células de uma das subpopulações (uma subpopulação enriquecida). Se o CV da característica de emissão de fluorescência das células da subpopulação enriquecida for igual ou menor que o CV predeterminado no qual ocorre a separação, então, o restante da amostra de célula será tingido de acordo com as condições de acordo com as quais a fração foi tingida. A amostra é separada, depois disso, por exemplo, de acordo com os métodos discutidos aqui. Se o CV da característica de emissão de fluorescência específica das células da subpopulação enriquecida for maior que o CV predeterminado no qual a separação ocorre, então, outra fração da mesma amostra será analisada de maneira similar, mas, nas condições de tingimento, acredita-se que seja alcançado um CV ainda mais baixo. Em tal situação, o CV pode ser diminuído, por exemplo, com o aumento do comprimento do

período de tingimento, com o aumento da concentração do corante, com o aumento da temperatura na qual a fração é tingida, ou com qualquer combinação dos mesmos. Esta série de etapas (isto é, a remoção de uma fração da amostra a ser separada, o ajuste das condições de tingimento, e uma determinação do CV) é repetida até que o CV da característica de emissão de fluorescência específica das células da subpopulação enriquecida seja determinado para ser igual ou menor que o CV predeterminado. Depois disso, o restante da amostra é tingido de acordo e pode ser separado, por exemplo, de acordo com os métodos descritos aqui. Em uma concretização específica da invenção, a amostra de células compreende uma amostra de sêmen, e as células da subpopulação enriquecida compreendem células de espermatozoides conduzindo cromossomos X.

[00301] Conseqüentemente, uma concretização da invenção é um processo para avaliar um conjunto de condições para tingir uma população de células para separação, a população compreendendo um primeiro tipo e um segundo tipo de célula. O processo compreende (a) o tingimento de uma fração da população de células com um corante fluorescente, de acordo com um conjunto de condições de tingimento; (b) a exposição das células tingidas à radiação eletromagnética à medida que as células tingidas são passadas através de uma localização de interrogação de um citômetro de fluxo em uma taxa e; (c) a determinação de uma característica de emissão de fluorescência das células expostas; (d) o uso da característica de fluorescência determinada para classificar as células em duas ou mais subpopulações, uma das subpopulações sendo uma população enriquecida do primeiro tipo de célula; (e) a determinação de um coeficiente de variação para a característica de emissão de fluorescência das células da subpopulação enriquecida; e (f) a determinação de modificar ou não qualquer condição de tingimento de acordo com as quais as células são tingidas ou a ta-

xa R na qual as células tingidas são passadas através da localização de interrogação do citômetro de fluxo. Em outra concretização, outra fração da população de células é tingida de acordo com um conjunto diferente de condições de tingimento, e as etapas de (b) a (e) são repetidas com essa fração. Este processo pode ser executado em dois, três, quatro, ou qualquer número de frações adicionais. Em outra concretização, múltiplas frações de células são extraídas da amostra ao mesmo tempo. Cada fração pode ser tingida simultaneamente, ou cada uma pode ser tingida subsequente à fração anterior que é passada através do citômetro de fluxo. No caso anterior, cada fração pode ser tingida com seu próprio conjunto exclusivo de condições de tingimento, e a etapa (f) pode compreender o uso dos respectivos CVs para determinar que um conjunto de condições de tingimento seja usado para tingir as células adicionais. No último exemplo, as condições de tingimento das frações subsequentemente tingidas podem ser alteradas de acordo com a determinação da etapa (f) com relação a uma fração anteriormente analisada. Em uma concretização, o processo é repetido até que o CV seja determinado para ser aproximadamente igual ou menor que um CV específico (por exemplo, 1,3%).

[00302] Alternativamente, uma vez que tenha sido predeterminado que um CV no qual uma eficiência de separação aceitável será alcançada, toda a amostra de célula poderá ser tingida. Uma fração da amostra de célula é removida e submetida à análise de citometria de fluxo. Uma característica de emissão de fluorescência da fração é determinada e usada para classificar as células em duas ou mais subpopulações. O CV da característica de fluorescência é determinado com relação às células de uma subpopulação enriquecida. Se o CV da característica de emissão de fluorescência das células da subpopulação enriquecida for igual ou menor que o CV predeterminado no qual ocorre a separação, então, o restante da amostra de célula será posterior-

mente separado. Se o CV da característica de emissão de fluorescência específica das células da subpopulação enriquecida for maior que o CV predeterminado no qual ocorre a separação, então, uma segunda fração da mesma amostra será analisada de maneira similar e o CV da mesma característica de fluorescência será determinado. O CV da segunda fração poderá ser diminuído, por exemplo, com o aumento da duração do período de tingimento, o aumento da concentração do corante, ou qualquer combinação dos mesmos. Esta série de etapas (isto é, a remoção de uma fração da amostra a ser separada e uma determinação do CV) é repetida até que o CV da característica de emissão de fluorescência específica das células da subpopulação enriquecida seja determinado para ser igual ou menor que o CV predeterminado. Depois disso, o restante da amostra pode ser separado, por exemplo, de acordo com os processos descritos aqui. Em uma concretização específica da invenção, a amostra de célula compreende uma amostra de sêmen, e as células da subpopulação enriquecida compreendem células conduzindo cromossomos X.

[00303] Conseqüentemente, outra concretização da invenção é um processo para avaliar um conjunto de condições para tingir uma população de células para separação, a população compreendendo um primeiro tipo e um segundo tipo de célula. O processo compreende (a) o tingimento de uma fração da população de células com um corante fluorescente de acordo com um conjunto de condições de tingimento; (b) a exposição das células tingidas à radiação eletromagnética à medida que as células são passadas através de uma localização de inter-rogação de um citômetro de fluxo em uma taxa R; (c) a determinação de uma característica de emissão de fluorescência das células expostas; (d) o uso da característica de emissão de fluorescência determinada para classificar as células em duas ou mais subpopulações, uma das subpopulações sendo uma subpopulação enriquecida do primeiro

tipo de células; (e) a determinação de um coeficiente de variação para a característica de emissão de fluorescência das células da subpopulação enriquecida; (f) a determinação de modificar ou não qualquer condição de tingimento de acordo com a fração de células que é tingida ou a taxa R na qual as células tingidas são passadas através da localização de interrogação do citômetro de fluxo; e (g) a aplicação da condição de tingimento modificada ao restante da população de células. Em outra concretização, as etapas (a) a (f) são repetidas pelo menos uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes ou um número maior de vezes. Em outra concretização, múltiplas frações de células são simultaneamente retiradas da amostra. Cada amostra pode ser simultaneamente tingida, ou cada qual pode ser tingida subsequente à fração anterior que é passada através do citômetro de fluxo. No último exemplo, o tingimento subsequente das frações pode ser alterado de acordo com a determinação da etapa (f) com relação a um tingimento previamente analisado. Em ainda outra concretização, o processo adicionalmente compreende, antes da etapa (g), a seleção da condição de tingimento modificada que resulta no mais baixo coeficiente de variação para a característica de emissão de fluorescência. Em ainda outra concretização, o processo compreende as etapas de repetição de (a) a (e) até que o coeficiente de variação para a característica de emissão de fluorescência de pelo menos uma das frações seja de cerca de 1,3% ou menos. Em outra concretização da invenção, o processo adicionalmente compreende, antes da etapa (g), a seleção da condição de tingimento modificada que resulta em um coeficiente de variação de cerca de 1,3 ou menos.

[00304] Além de executar tal análise antes da separação de toda a amostra, conforme detalhado acima, uma análise similar pode ser executada enquanto o tingimento e a separação da amostra está ocorrendo em um esforço para assegurar que a eficiência de separação

seja mantida. Conseqüentemente, em outra concretização, o CV de uma característica de emissão de fluorescência das células de uma subpopulação enriquecida de uma fração de uma amostra que foi anteriormente tingida, uma porção da dita amostra que está no processo de ser separada, é determinado conforme descrito acima. Os ajustes às condições de tingimento de acordo com os quais esta amostra foi tingida são feitos de acordo com os métodos discutidos acima com relação aos ajustes de pré-separação.

[00305] A seleção de um CV predeterminado no qual será alcançada uma eficiência de separação aceitável se baseia em diversos fatores, incluindo, por exemplo, o tipo de célula que é separado, a taxa de separação, e o grau de pureza desejado com relação à separação da população em subpopulações enriquecidas. Geralmente, um CV é selecionado, o que permite a separação com relação à pureza de porcentagem desejada da subpopulação enriquecida enquanto minimiza a quantidade de tempo necessário para se alcançar o mesmo, tal como, por exemplo, com a obtenção de um grau de pureza de 85% da subpopulação enriquecida enquanto minimiza a duração do período de tingimento. Com estes fatores em mente, o CV da característica de emissão de fluorescência das células de uma subpopulação enriquecida está geralmente entre cerca de 2,0% e cerca de 1,0%, preferivelmente entre cerca de 1,5% e cerca de 1,0%, mais preferivelmente de cerca de 1,4%, e ainda mais preferivelmente de cerca de 1,3%.

M. Extração de Característica de Diferença Crítica do Grau de Inclinação

[00306] O microprocessador 131' com processamento de sinal digital (DSP), ilustrado na figura 40, empregado como parte de um separador de célula permite extrair características do pulso de emissão de fluorescência resolvido por tempo, particularmente características que não podem ser facilmente ou economicamente obtidas com o uso da

tecnologia analógica. Em particular, uma característica de pulso que exhibe propriedades não-lineares e que significativamente aperfeiçoa a separação e, portanto, a resolução de partículas A e B (por exemplo, aperfeiçoa a discriminação de células de esperma X alinhadas vivas) é uma característica denominada de diferença crítica do grau de inclinação (CSD). A CSD é uma quantificação do grau de inclinação do pulso de emissão de fluorescência em uma amplitude de sinal onde a diferença entre o primeiro derivativo de um pulso produzido pela partícula A (por exemplo, uma célula conduzindo o cromossomo X) e o primeiro derivativo de um pulso produzido pela partícula B (por exemplo, uma célula conduzindo cromossomos Y) se aproxima de um máximo.

[00307] As funções que descrevem os pulsos de emissão de fluorescência podem ser expressas em termos da amplitude de sinal como uma função do tempo: $y = x(t)$. Dentro do contexto de detecção de características CSD, pode ser definida uma função, a qual descreve os pulsos de emissão de fluorescência em termos de tempo de duração de pulso como uma função da amplitude de sinal. Esta função pode ser denominada de função M. A função M é obtida com a transposição da função de pulso de emissão de fluorescência, conforme mostrado abaixo:

Função de Pulso de Emissão de Fluorescência: $y=x(t)$

[00308] Função M: $t = M(y)$

[00309] t = duração do pulso

[00310] y = amplitude do sinal

[00311] A comparação das funções M para as células de esperma bovino X e Y ilustra a potência de discriminação da característica CSD. O painel superior da figura 64 mostra gráficos M médios para células de esperma conduzindo cromossomos X e cromossomos Y. O painel do meio na figura 64 mostra um gráfico dos primeiros derivativos destes gráficos M médios (isto é M') para valores de amplitude de sinal

menores que a altura de pico do pulso de emissão de fluorescência conduzindo cromossomos Y. Pode ser visto neste gráfico que, à medida que a amplitude do sinal se aproxima da altura de pico média do pulso conduzindo cromossomos Y, a diferença entre os primeiros derivativos (M_y e M'_x) aumenta de modo significativo. No painel inferior da figura 64 é traçada a diferença entre os primeiros derivativos ($M'_x - M'_y$) como uma função da amplitude do sinal. A característica CSD quantifica o grau de inclinação de M (M') para um pulso individual perto da região onde ocorre a diferença máxima nos primeiros derivativos (ou o grau de inclinação em um ponto correspondente na função de pulso de emissão de fluorescência). Para fins de discriminação das células de esperma conduzindo cromossomos X e Y, a CSD é determinada para cada pulso no ponto onde a borda dianteira do pulso intersecta o limite de CSF, conforme mostrado nas figuras 62-63. Em algumas concretizações, a CSD poderá depender das características do feixe de iluminação, tal como a largura de feixe, se o feixe for contínuo ou pulsado. Um algoritmo para determinar CSD é discutido abaixo com relação à figura 65.

[00312] A figura 65 ilustra que, em alguns casos, a característica CSD apresenta uma natureza não-linear, tal como no caso de populações de células de esperma X-Y de separação. A diferença entre os derivativos ($M'_x - M'_y$) aumenta à medida que o limite CSD se aproxima do pico do pulso Y. A característica não-linear desta diferença põe o valor médio das células não-alinhadas e as células Y alinhadas 45% mais baixo que o valor médio das células X alinhadas no espaço de característica CSD. O desvio padrão no espaço de característica CSD das células X alinhadas é grandemente não-afetado (isto é, similar àquele visto nos espaços de característica de pico ou área). É esta natureza não-linear de ganho elevado da característica CSD que aumenta o número de células X alinhadas que pode ser discriminado

com precisão.

[00313] Um processo computacionalmente eficiente para determinar o valor CSD para um determinado pulso é ilustrado na figura 65. Um limite CSD pode ser determinado como uma função da altura de pico dos pulsos de emissão de fluorescência. Em particular, ele pode ser determinado com base na altura de pico média dos pulsos de emissão de fluorescência. O limite CSD é mantido em um ponto onde cerca de 25% dos picos de pulso originários das células alinhadas vivas caem no limite ou abaixo deste. Por isso, o limite CSD é ajustado dinamicamente durante a separação com base em uma distribuição de altura de pico corrente (isto é, com relação a uma altura de pico média). Por exemplo, o limite pode se basear em uma média corrente ponderada de altura de pico (com medições mais recentes recebendo um maior peso do que as medições antigas). O valor CSD é o grau de inclinação de uma linha que passa através de dois pontos no pulso. Estes pontos são o limite de pulso CSD e o pico de pulso. Portanto, nesta concretização, o valor CSD é apenas uma aproximação do grau de inclinação da forma de onda de pulso 497 na interseção da borda dianteira do pulso e do limite CSD. Entretanto, outros métodos de computar o valor CSD para um determinado pulso são prontamente evidentes, alguns dos quais podem prover valores CSD mais precisos, caso desejado.

[00314] Em outra concretização, o limite CSD é dinamicamente ajustado como uma função do CV da extração de característica CSD para uma subpopulação de partículas. No caso de separação de células de esperma, por exemplo, com o aumento do limite CSD de um nível relativamente baixo (por exemplo, o limite de detecção de pulso), o limite CSD irá alcançar um nível que resulta em um aumento substancial no CV da CSD das células Y, mas ainda é baixo o suficiente que o aumento no CV da CSD para as células X é significativamente

inferior em comparação ao aumento do CV nas células Y. Este efeito pode ser observado na distribuição CSD como um espalhamento de uma subpopulação em toda a distribuição CSD. Uma boa discriminação da característica CSD pode ser conseguida mantendo-se o limite CSD neste nível.

[00315] Deve ser notado que a potência de discriminação da característica CSD é intensificada pelo uso de abordagem de varredura de ranhura na citometria de fluxo. A forma do ponto de feixe 459 pode influenciar a forma da forma de onda de pulso 497. Por exemplo, com o uso de um ponto de feixe 459 apresentando uma largura relativamente pequena W1, uma diferença de fluorescência localizada em uma partícula de amostra (por exemplo, a diferença de intensidade fluorescente localizada resultante da localização do cromossomo X ou Y na região central 225 de um núcleo de esperma 213) apresenta uma maior influência sobre o derivativo de primeira ordem da forma de onda de pulso. Conseqüentemente, uma concretização da presente invenção inclui o uso de técnicas de varredura de ranhura em combinação com a extração de característica CSD. Contrariamente, o uso de um laser apresentando um estreitamento de feixe que é grande demais (por exemplo, igual ou maior que o diâmetro das partículas) pode impedir o eficaz uso da característica CSD para discriminar partículas. A faixa aceitável para a largura do estreitamento de feixe do feixe de iluminação focalizado irá depender de inúmeros fatores incluindo o tamanho e a forma das partículas, a distribuição de corante dentro das partículas que são analisadas, e o grau de diferença entre os pulsos de forma de onda típicos para as partículas a serem discriminadas. No caso de células de esperma, a extração da característica CSD dos pulsos de forma de onda 497 gerados pela excitação de células de esperma bovino 201 com um laser apresentando um estreitamento de feixe de menos de 3 μm trabalhou bem, conforme indicado abaixo. Naturalmente, a

extração de característica com qualquer forma de varredura de ranhura discutida na seção de varredura de ranhura é considerada como estando dentro do escopo deste aspecto da invenção.

[00316] O uso da característica CSD substancialmente aumenta a produtividade do sistema, particularmente no caso de populações de células de esperma X-Y, porque ele permite a coleta de muito mais células X alinhadas. Devido à sobreposição nas populações definidas nos espaços de característica de pico versus área ou de elevação de tempo versus área, não mais do que cerca de 70% das células X alinhadas podem ser discriminados com uma certeza aproximada ou maior que 85%. Quando a característica CSD for usada, 95% ou mais das células X alinhadas poderão ser discriminados, o que significativamente aumentará a porcentagem de células X vivas que pode ser coletada sem reduzir a pureza da população das células X coletadas abaixo de um nível desejado de pureza.

[00317] Isto é graficamente visto nos dados de célula viva mostrados nas figuras 66-69. A natureza não-linear da característica CSD permite que células X sejam isoladas para separação. A seleção bruta na CSD aplicada no gráfico de dispersão mostrado na figura 68 resulta em 70% de população de área X pura. Quando a discriminação de separação bivariável for aplicada na área e a característica CSD for espaçada (figura 68), >95% das células X alinhadas poderão ser discriminadas para separação. Os dados nas figuras 66-69 foram coletados em um rendimento total de célula de cerca de 22.000 células vivas por segundo em um canal de um sistema de citometria de quatro canais (vide o sistema de múltiplos canais discutido acima). Mesmo com a detecção de coincidência ativada (pureza elevada), um montante acima de 6.000 células X por segundo foi coletado em um nível de pureza de pelo menos 85% de pureza.

[00318] As figuras 66-69 ilustram uma vantagem da característica

CSD, quando usada para discriminar células de esperma conduzindo cromossomos X e Y. As figuras 66 e 67 são histogramas da característica de área dos pulsos de emissão de fluorescência para o espaço de característica definido nos gráficos de dispersão mostrados nas figuras 68 e 69. Na figura 68, a característica CSD moveu a maioria das células Y não-alinhadas e alinhadas completamente fora da visualização do gráfico de dispersão. Isto deixa uma população X de 70% na armadura do gráfico de dispersão, que é o que é mostrado no histograma da área de pulso na figura 66. A discriminação CSD é mostrada no gráfico de área de pulso/dispersão de tempo de elevação mostrado na figura 69. As células X alinhadas formam cerca de 30% do histograma de área correspondente (figura 67). Mais de 95% das células X alinhadas podem ser coletados em >85% de pureza com o uso da característica CSD para discriminação. Por meio de comparação, não mais de 70% das células X alinhadas podem ser discriminados com o uso do espaço de características tradicional à direita.

[00319] Diversas separações de células vivas foram completadas com o uso da técnica de discriminação variável de CSD versus a área de pulso. A figura 70 é um exemplo de como uma região de separação neste espaço de característica bidimensional pode ser usada para excluir as células não-alinhadas e as células Y. A figura 70 ilustra uma região de separação bivariável ajustada em um gráfico de dispersão de CSD versus dispersão de área de pulso. É notado que como a região de separação cai mais baixo na característica de área para valores elevados de CSD (a CSD aumenta da esquerda para a direita e a área aumenta de baixo para cima) e se move mais alto na característica de área à medida que a CSD cai para valores mais baixos. A região de separação bivariável ajustada no gráfico de dispersão de área de pulso versus CSD foi usada para separar células X em uma taxa de decisão de separação > 6.000 células X por segundo com uma taxa de

célula viva de entrada de 26.000 células por segundo. A pureza com base na reanálise de citometria de fluxo foi de 87%.

[00320] A característica CSD permite uma estratégia de separação de abortagem de não-coincidência de alto rendimento (isto é, aceitação coincidente ou alta recuperação). Em algumas concretizações, uma característica de pulso poderia prover aproximadamente uma separação de linha de base e, portanto, uma classificação 100% precisa de células de esperma X e Y vivas. Esta condição permitiria a separação de células em taxas razoavelmente altas sem abortar gotículas que contêm tanto uma célula classificada como X ou não-X (desconhecida ou Y). Esta estratégia de separação é denominada de estratégia de alta recuperação ou de aceitação de coincidência. Um experimento foi executado para testar este uso da característica CSD. As separações de aceitação de coincidência foram executadas com uma taxa de entrada de 12.000 células X vivas por segundo em um canal de um citômetro de fluxo de quatro canais. 77% das células X foram adequadamente alinhados, formando 4.600 células X por segundo potencialmente disponíveis para separação. Sob estas condições, 4.300 células por segundo foram separadas na população de células X. A análise de pureza subsequente indicou uma pureza desta separação de >87% sem correção para células mortas e 89% com correção para células mortas. Uma separação de detecção de rejeição de coincidência de pureza elevada foi executada imediatamente depois desta separação sob as mesmas condições. Uma taxa de coleta de 3200 - 3500 células por segundo foi observada. A análise de pureza indicou uma pureza de 92% sem correção para as células mortas e uma pureza de 94% com correção de célula morta.

[00321] Os resultados do experimento acima indicam que, na entrada de 12.000 células vivas por segundo, >92% de células X alinhadas podem ser coletadas em uma pureza de > 85%. Isto é uma indica-

ção de que a característica CSD apresenta uma classificação 95% precisa de todas as células X alinhadas. Sob estas circunstâncias, o rendimento do separador de célula é limitado principalmente pelo alinhamento correto da célula.

[00322] A figura 71 ilustra uma concretização das análises de citômetro de fluxo para um teste no qual o painel esquerdo corresponde à estratégia de separação de aceitação coincidente/alta recuperação (nenhuma estratégia de abortagem de coincidência), e o painel direito corresponde à estratégia de separação de rejeição coincidente/pureza elevada (estratégia de abortagem coincidente). O painel esquerdo (87%) se destina a uma saída de 4.400 células X por segundo sem abortagens de coincidência. O painel direito se destinada a uma separação completada sob as mesmas condições, exceto as gotículas contendo células contaminantes foram abortadas. A pureza para esta separação foi de cerca de 92%. Estas separações demonstram que separações de abortagem de não-coincidência e de alta recuperação serão possíveis, quando a característica CSD for usada para discriminação.

[00323] O uso da característica CSD não é limitada à separação de células de esperma ou qualquer espécie específica de células de esperma. Aqueles versados na técnica irão apreciar a partir da descrição anterior que a característica CSD pode ser adaptada para aperfeiçoar a discriminação entre quaisquer grupos de partículas que geram sinais de pulsos de sinal apresentando características diferentes de derivativo de primeira ordem, não obstante a causa da diferença.

N. Discriminação

[00324] Uma vez que as características dos pulsos tenham sido extraídas pelo software de análise de pulso 749, a discriminação (por exemplo, a classificação) dos pulsos é conseguida pelo software de discriminação de pulso 757 executado pelo processador 867 que em-

prega uma aplicação lógica, tal como a regra de decisão de Risco Mínimo de Bayes. Esta regra é uma modificação de uma regra de decisão de Erro Mínimo de Bayes que permite a atribuição (e o ajuste) de diferentes custos associados com diferentes decisões de classificação errônea (por exemplo, discriminação).

[00325] A regra de Erro Mínimo de Bayes computa o limite de decisão 763 ou a superfície de decisão como a superfície de igual probabilidade a posteriori entre populações no espaço de característica. Para o caso de distribuições de probabilidade Gaussianas (assumidas), esta superfície é, em geral, quadrática, embora em certas condições, possa ser linear (ou possa ser estritamente aproximada por um hiperplano). A decisão de classificação (por exemplo, discriminação) é feita primeiramente com a computação de probabilidades a posteriori para um ponto determinado no espaço de característica (geralmente a partir das densidades de probabilidade condicionais de classe e probabilidades de população a priori conhecidas/assumidas usando a Regra de Bayes) do que com a escolha do rótulo de classe como aquele da população apresentando a mais alta probabilidade a posteriori.

[00326] A regra de Risco Mínimo de Bayes inclui um fator para permitir o ajuste do limite de decisão 763 no caso quando for desejado atribuir diferentes custos para formar diferentes erros de classificação (por exemplo, pode ser mais caro classificar células "Y" como células "X", do que vice-versa). Nesta aplicação, isto permite uma troca entre recuperação e pureza de amostra separada. Nesta regra de decisão, o "risco" de atribuir cada rótulo de classe possível a um ponto no espaço de característica é computado como a soma de probabilidades a posteriori de associação em cada população vezes o custo associado com a classificação como população atual recebendo a verdadeira associação em cada outra população. A Tabela 6 sumariza o procedimento para a classificação da regra de Erro Mínimo de Bayes. É notado que

para densidades Gaussianas de múltiplas variáveis, a avaliação da regra de Bayes para se obter probabilidades a posteriori pode ser reduzida à avaliação da função quadrática vista na Tabela VII, uma vez que os coeficientes W , w , e w_0 se encontram conforme computados no procedimento de inicialização de parâmetro de algoritmo de discriminação fornecido na Tabela 3. A figura 74 mostra um exemplo gráfico de classificação por este procedimento. A ilustração à esquerda é uma ilustração esquemática das duas populações 1 e 2 e o limite de decisão 763 que separa as populações. O histograma à direita mostra dois conjuntos concêntricos de elipses que definem regiões X e Y, com o limite de decisão 763 sendo uma linha definida pela interseção das elipses.

1. Algoritmo: Classificação (discriminação) de pulso de fluorescência de Erro Mínimo de Bayes
2. Entrada: vetor de flutuações <i>pulseFeatures</i> , para cada população de classe <i>i</i> ; matriz de flutuações W_i , vetor de flutuações w_i , flutuação w_{i0}
3. Saída: Integer ClassLabel
4. Procedimento: Para cada classe/população <i>i</i> , computar valor de função discriminante g_i : $g_i = pulseFeatures^t \cdot W_i \cdot pulseFeatures + w_i^t \cdot pulseFeatures + w_{i0}$ 2. Para cada classe/população <i>i</i> , computar valor de função de risco $risk_i$: Inicializar $risk_i=0$ então para cada classe/população: $risk_i = risk_i + cost_{ij} * g_j$ 3. Encontrar <i>j</i> s.t. $risk_j = (\min(risk_i) \forall i)$. Retornar classLabel= <i>j</i> , e sair.

TABELA VII. Sumário de classificação (discriminação) de pulso de fluorescência digital pela regra de decisão de Erro Mínimo de Bayes.

[00327] Para robustez adicional, uma etapa adicional é assumida na classificação de pulsos de fluorescência digital. A distância de Mahalanobis de um pulso no espaço de característica da população

atribuída via Erro Mínimo de Bayes é computada, e se for maior que um limite, o pulso será rotulado de "não-classificado" ou alguma outra indicação apropriada que não seja provavelmente um membro de qualquer população conhecida. A figura 75 ilustra o efeito desta etapa adicional, novamente com o uso de características computadas a partir dos dados de pulso de fluorescência digitalmente adquiridos.

[00328] Em geral, o conversor A/D 689 converte os sinais de saída analógicos 701 do fotodetector 117 em informação digital correspondente 707 indicativa da característica A ou característica B (por exemplo, X ou $\sim X$). O processador de sinal digital 865 extrai as características da informação digital e o processador 873 supre um sinal de separação 853 para o sistema de separação como uma função das características extraídas.

O. Classificação de separação e Sincronização de Gotículas

[00329] O quarto processador de separação 873 gerencia a classificação de gotículas, implementa a estratégia de separação e distribui um pulso de disparo de separação 853 que é sincronizado com as gotículas selecionadas para separação. Este processador 873 recebe a informação de classificação de célula do processador de discriminação 867 e relata essa informação ao relógio de geração de gotículas 703 (isto é, alinha a posição de partículas classificadas para separação em uma população com a formação de gotículas). Ele determina se há coincidência dentro de uma gotícula e gerencia essa coincidência com base nas estratégias de separação predeterminadas. Ele mantém um armazenamento FIFO de todas as classificações de célula e decisões de separação de gotículas que ajusta o retardamento correto entre quando a partícula foi observada em tempo real e quando a partícula chega na última gotícula conectada. Ele irá produzir um pulso de saída adequadamente sincronizado 853 de polaridade adequada e amplitude para cada gotícula selecionada para separação.

[00330] Em geral, o conversor A/D 689 converte os sinais de saída analógicos 701 originários do fotodetector 117 em informação digital correspondente 707 indicativa da característica A ou característica B (por exemplo, X ou $\sim X$). O processador de sinal digital 867 discrimina a informação digital 707 como indicativa da característica A ou como indicativa da característica B (por exemplo, X ou $\sim X$) e supre um sinal de separação 853 para o sistema de separação 119 como uma função da informação digital discriminada.

[00331] Em geral, os processadores de sinal digital 863, 865, 867, 873 incluem instruções para detectar pulsos de forma de onda representados pela informação digital, instruções para extrair características nos pulsos detectados, e instruções para discriminar os pulsos detectados como uma função de suas características extraídas. Além disso, os processadores incluem instruções para definir um limite de decisão 763 que discrimina entre as características extraídas representando a característica A e as características extraídas representando a característica B. Adicionalmente, os processadores 863, 865, 867, 873 podem opcionalmente ajustar a relativa localização do limite de decisão 763 com relação às características extraídas representando a característica A e com relação às características extraídas representando a característica B como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B, e (2) a quantidade de partículas de característica A e partículas de característica B em pelo menos uma população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou partículas de característica B no fluxo. Por exemplo, o processador pode mover o limite de decisão 763 para incluir menos da população 1 e mais da população 2, ou vice-versa, com base na saída de uma amostra específica ou com base na saída desejada (por exemplo, conforme notado acima com relação à

regra de decisão de Risco Mínimo de Bayes para ajustar o limite de decisão para diferentes custos).

P. Compensação de Desvio

[00332] Uma vez que com o tempo os pulsos de forma de onda correspondentes às emissões de fluorescência podem variar ou exibir desvio com o tempo (devido às variações de tingimento, à mudança de temperatura, à idade da amostra e/ou a outros fatores, por exemplo), o sistema pode opcionalmente empregar o software de análise de desvio 761 (figura 72) definindo limites dinâmicos que variam para compensar quaisquer efeitos de desvio. Em particular, os limites de detecção de pulso empregados pelo software 747 podem ser ajustados para quaisquer variações lentas nas características de fundo de sinal, e o algoritmo de discriminação do software 757 pode ajustar o limite de decisão 763 (figura 74) para responder por qualquer desvio nas populações no espaço de característica.

[00333] No caso do(s) algoritmo(s) empregado(s) pelo software de detecção de pulso 747, o software de compensação de desvio 761 executa a compensação de desvio com a atualização das estimativas de desvio padrão e média de fundo com base nas estimativas de estatística computadas dentro de uma janela móvel de um determinado comprimento de amostras (por exemplo, 10-100 amostras) terminando com a amostra atual. Uma vez que a taxa de desvio lento (assumido) com relação à frequência de aquisição de dados, a estatística de fundo não precisa ser atualizada a cada amostra; em vez disso, atualizações de estatística de fundo podem ocorrer periodicamente (por exemplo, a cada 6 segundos; vide caractere de referência 795 e figura 82). Adicionalmente, a janela pode conter menos que uma ponderação de unidade para permitir que uma taxa de "esquecimento" não pondere amostras mais antigas com relação às amostras mais recentes nas computações de estatística. A figura 76 ilustra o conceito de computa-

ção estatística (média) dentro de uma janela móvel sem e com uma taxa de "esquecimento".

[00334] Similar à compensação de desvio de algoritmo de detecção, o(s) algoritmo(s) de discriminação empregado(s) pelo software de discriminação de pulso 757 alcança(m) a compensação de desvio pelas atualizações periódicas da estatística de 2ª ordem das populações no espaço de característica. Neste caso, entretanto, apenas aqueles valores originários de pulsos atribuídos a uma determinada população são usados para atualização da estatística dessa população. Novamente, a não ponderação de unidade pode ser usada para incluir uma taxa de "esquecimento". A figura 77 mostra uma ilustração conceitual dos efeitos de aplicação desta técnica às populações no espaço de característica. A figura 77 ilustra um exemplo de compensação de desvio para estatística de população no espaço de característica. O amarelo indica a população 1 (X), o verde a população 2 (Y), diamantes, as estimativas de média de classe (com uma ilustração exagerada de desvio), e mudanças das setas de bloco nas estimativas de covariação de população refletidas na deformação das elipses de sigma-constante.

[00335] Em geral, o processador de sinal digital 863 emprega um limite de detecção para analisar a informação digital, cujo limite é uma função de uma estimativa média de fundo e de um desvio padrão dos sinais de saída de variação de tempo amostrados computados dentro de uma janela móvel de amostras terminando com a amostra corrente.

Q. Vantagem de Todas as Técnicas Digitais sobre as Técnicas Analógicas

[00336] Uma das vantagens principais para uso de um sistema digital para separação é a de que não há qualquer "tempo morto" associado com a detecção e a análise de um pulso. Com os sistemas analógicos, é sempre exigido um "tempo de comutação" finito para a eletrô-

nica se restabelecer depois da ocorrência e da detecção de um pulso. Este tempo é geralmente na ordem de pelo menos um microssegundo. Uma vez que o sistema digital captura um fluxo contínuo, ele realmente não apresenta qualquer tempo morto.

[00337] Outra vantagem de um sistema digital é a capacidade de olhar para frente e para trás no tempo em torno de um pulso classificado para separação. Em geral, o processamento de sinal digital exige cerca de cinco (5) períodos de gotículas para análise. Preferivelmente, o retardamento de tempo entre a iluminação de gotículas 115 e a formação de gotículas 107 é de cerca de sete (7) períodos de gotículas. Isto permite que o sistema classifique uma partícula específica com base na probabilidade em que ela irá contaminar a população utilizável, conforme indicado pelas características da partícula específica e com base na proximidade da partícula específica à outra partícula classificada. Como um exemplo, o processador de separação 873 pode rejeitar uma partícula vista como apresentando 50% de probabilidade de ser uma célula X viva, ao passo que o processador de separação 873 poderá aceitar uma partícula vista como apresentando 50% de probabilidade de ser uma célula X viva, quando a partícula for coincidente com uma segunda partícula vista como tendo 95% de probabilidade de ser uma célula X viva.

R. Análise de Célula Analógica

[00338] Também é contemplado que os sinais de saída de variação de tempo do fotodetector possam ser processados pelos circuitos analógicos 819, tal como uma disposição de porta programável de campo, o que pode ser mais econômico do que um analisador de célula digital. A figura 42 é um diagrama de bloco de uma concretização de um analisador de célula analógico que pode ser empregado como parte do sistema de acordo com a invenção. A figura 53 graficamente ilustra a análise analógica. Um limite é ajustado para produzir um disparo com

base na altura do pulso. O limite abre uma janela de integração que liga um integrador analógico à carga de acumulação. A janela permanece aberta ou por um período fixo ou até que a amplitude do pulso caia para abaixo do limite de disparo. Desta maneira, apenas a área da porção do pulso dentro da janela de integração é usada para as relativas medições de fluorescência.

[00339] Com referência à figura 42, a saída 701 do fotodetector 117 é suprida a um integrador 825 que integra o sinal de saída 701 em sincronização com o relógio de gotículas 703. O sinal integrado é provido a um comparador de largura/área 827 para comparar o nível do sinal integrado a um nível limite que define um pulso (por exemplo, um pulso pode ser definido como um sinal integrado com 40% de certeza de um limite certo). Um calculador de limite dinâmico 829 funciona similarmente à compensação de desvio notada acima em que monitora o nível de sinal integrado e varia o nível limite que o comparador de largura/área usa como uma função das variações no nível de sinal integrado médio.

[00340] O sinal discriminado de pulso é provido a um comparador de janela 837 para confirmar que a área de pulso está dentro de uma faixa aceitável. O sinal discriminado de pulso é também provido a um circuito lógico de disparo e de largura de pulso 839 para confirmar que a largura de pulso está dentro de uma faixa aceitável. Se a área e a largura forem aceitáveis, o circuito lógico suprirá um sinal de disparo para um controlador de entrada/saída 843 que indica a decisão de separação 841. Desse modo, o comparador de janela 837 e o circuito lógico de disparo e de largura de pulso 839 tomam a decisão de se uma célula deve ou não ser classificada como uma célula X ou uma célula $\sim X$.

[00341] O controlador I/O 843 supre a decisão de separação 841 à placa de controlador de separação 847 na forma de um sinal X ou $\sim X$.

O controlador I/O 843 também inclui uma interface de Barramento Serial Universal (USB) 849 para conectar ao PC 735 e pode ter uma porta I/O para conexão aos controladores escravos 845 dos outros canais. O analisador de célula analógico também inclui uma porta de Grupo de Acesso de Teste de Junção (JTAG) 833 para programar o comparador de largura/área, o comparador de janela e a lógica de disparo e de largura de pulso.

[00342] Também é contemplado que o analisador de célula analógico possa ser empregado simultaneamente com o analisador de célula digital 705. Por exemplo, o analisador analógico pode ser usado para ajustar os limites de tensão usados pelo analisador digital. Por outro lado, o analisador digital pode ser usado para identificar várias características do pulso, e esta informação de característica poderá ser usada para configurar o analisador de célula analógico, particularmente, se ele for implementado com uma disposição de porta.

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

[00343] Em geral, o microprocessador 131 é programado para implementar estratégias de controle e de separação que se destinam a otimizar a eficiência do sistema 1 em termos de produtividade e/ou perda de partículas desejadas para atender a quaisquer exigências de custo do produto separado. Isto pode envolver, por exemplo, o equilíbrio da necessidade de pureza elevada de pelo menos uma população coletada e a necessidade de recuperar pelo menos uma porcentagem mínima de partículas desejáveis da amostra que é separada. Alcançar este equilíbrio é importante, particularmente, no contexto de aplicações comerciais onde o custo e a utilidade são considerações importantes.

[00344] Para esta finalidade, o microprocessador 131 implementa uma estratégia de controle que é uma série de instruções e/ou algoritmos que controlam as variáveis do sistema, tais como os parâmetros

de separação e/ou taxa de distribuição de fluido. O microprocessador também implementa uma estratégia de separação que define o processo de decisão para determinar como cada partícula ou grupo de partículas é separado. Cada estratégia de controle específica pode empregar uma ou mais estratégias de separação. Várias estratégias de separação podem ser usadas dependendo de tais fatores como a estratégia de controle selecionada, o sistema de detecção de partículas e/ou a informação relacionada à distribuição de partículas no fluxo de fluido.

[00345] Com relação à distribuição de partículas, a figura 78 ilustra um fluxo de fluido contendo uma distribuição exemplificativa de partículas. Neste exemplo específico, o fluxo é formado por um bocal similar ao bocal descrito acima e contém uma mistura de partículas apresentando diferentes características A e B, por exemplo, células de esperma X e Y. Conforme mostrado, as células seguem geralmente uma depois da outra em uma série que pode ser vista como compreendendo conjuntos seqüenciais de partículas. Estes conjuntos incluem primeiros conjuntos de partículas, compreendendo cada qual uma ou mais partículas apresentando uma característica A (por exemplo, indicando uma célula de esperma X viva), segundos conjuntos de partículas, cada qual compreendendo uma ou mais partículas apresentando uma característica B (por exemplo, indicando uma célula de esperma Y ou, mais geralmente, uma célula de esperma que não é uma célula X viva ($\sim Z$), tal como uma célula Y, ou uma célula X e Y morta), e terceiros conjuntos de partículas, cada qual compreendendo duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresenta a característica A e pelo menos uma das quais apresenta a característica B (por exemplo, uma ou mais células de esperma X e uma ou mais células de esperma $\sim X$). Terceiros conjuntos de partículas são também adiante denominados de conjuntos de partículas

"coincidentes".

[00346] Uma partícula específica ser considerada ou não como constituindo um conjunto por si mesma ou parte de outro conjunto irá depender principalmente de sua posição espacial e/ou separação com relação às partículas adjacentes. Por exemplo, em um sistema de separação de gotículas, os vários conjuntos de partículas serão definidos pelas partículas nas gotículas. Em um sistema de separação por fotodeterioração onde um laser é usado para remover (matar ou, de outra maneira, danificar) conjuntos de partículas selecionados para prover uma população coletada apresentando um teor desejado, conforme discutido abaixo na seção "Separação por Fotodeterioração", os diversos conjuntos de partículas serão definidos pela proximidade espacial das partículas, isto é, se a separação espacial entre as partículas for suficiente para permitir a classificação precisa das partículas e/ou a ablação de uma ou mais partículas indesejadas pelo laser sem também remover uma ou mais partículas desejadas. Similarmente, em um sistema de separação de ligação de fluido onde porções do fluxo contendo partículas selecionadas são desviadas para proverem uma população coletada apresentando um teor desejado, conforme é discutido abaixo no sistema de "Separação de Transferência de Fluxo", os vários conjuntos de partículas serão definidos pela proximidade espacial das partículas, isto é, se a separação espacial entre as partículas é suficiente para permitir a classificação precisa das partículas e/ou o desvio das partículas selecionadas.

[00347] Será observado a partir do antecedente que a decisão de separação aplicada aos diferentes conjuntos de partículas pode ser variada, dependendo do resultado desejado ou do rendimento do sistema. Por exemplo, em um sistema de separação de gotículas, a estratégia de separação usada pode depender do tratamento de gotículas "coincidentes", isto é, gotículas contendo terceiros conjuntos de

partículas. Na manipulação de células de esperma bovino no sistema e método de separação de gotícula de citômetro de fluxo, conforme descrito aqui, por exemplo, para aumentar o número de células de esperma X em pelo menos uma população coletada, pode ser desejável usar uma estratégia onde cada gotícula coincidente contendo uma célula de esperma X é aceita e separada como se ela contivesse apenas células de esperma X, mesmo que a gotícula possa também conter uma célula de esperma $\sim X$ (estratégia de aceitação coincidente). Por outro lado, para aumentar a pureza das células de esperma X coletadas na população indicada, pode ser desejável rejeitar cada gotícula coincidente contendo uma célula de esperma $\sim X$ mesmo que a mesma gotícula possa também conter uma célula de esperma X (estratégia de rejeição coincidente). Em geral, conforme será indicado abaixo, há muitas estratégias de controle que podem ser empregadas para maximizar o rendimento de partículas e há muitas estratégias de separação que podem ser empregadas com cada estratégia de controle específica. As estratégias podem ser aplicadas às várias técnicas de separação usando a citometria de fluxo, tais como a separação de gotícula, a separação por fotodeterioração, e a separação de ligação de fluido. Adicionalmente, as estratégias acima podem ser usadas para separar qualquer tipo de partícula de acordo com qualquer característica ou características desejadas da partícula.

[00348] De acordo com uma concretização, o microprocessador controla a taxa na qual o sistema de distribuição de fluido distribui o fluido contendo as partículas como uma função de outras variáveis do sistema. Por exemplo, o microprocessador pode controlar a taxa de distribuição de fluido como uma função de um resultado de saída desejado. Uma vez que o microprocessador determina a identidade de cada partícula e determina se esta é dirigida a pelo menos uma população coletada, o microprocessador poderá determinar e controlar o

resultado de saída com a variação da estratégia de controle e/ou com a variação da estratégia de separação. Um resultado de saída desejado pode geralmente ser definido como pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma população coletada com relação às partículas de característica A ou às partículas de característica B ("alta recuperação"), e (2) a quantidade de partículas de característica A na população indicada com relação à quantidade total de partículas de característica A no fluxo, ou a quantidade de partículas de característica B na população indicada com relação à quantidade total de partículas de característica B no fluxo ("pureza elevada"). Como outro exemplo, o sistema pode empregar uma taxa de distribuição de fluido substancialmente constante e o microprocessador pode controlar os parâmetros de separação como uma função de um resultado de saída desejado. Neste último exemplo, o resultado de saída desejado pode geralmente ser definido como uma combinação da (1) pureza das partículas em pelo menos uma população coletada e da (2) quantidade de partículas desejadas disponíveis no fluxo, mas não incluídas na população indicada ("taxa de fluxo constante").

[00349] Em geral, pode ser assumido que quando da separação de duas populações, uma célula identificada poderia ter uma probabilidade de 50/50 de ser parte de uma população ou de outra. Entretanto, também é contemplado que uma célula não-identificada possa, de fato, ter alguma outra probabilidade diferente de uma probabilidade de 50/50 de ser parte de uma população ou de outra. Esta outra probabilidade pode ser determinada pela análise empírica ou a partir de outras características relacionadas à amostra que é separada.

[00350] Várias estratégias de controle diferentes são discutidas em maiores detalhes abaixo.

A. Estratégia de Controle de Alta Recuperação

[00351] Um tipo de estratégia de controle pode ser denominado de

estratégia de controle de "alta recuperação". O objetivo desta estratégia é a de maximizar o número de partículas desejadas na população de partículas desejadas, contanto que a pureza dessa população se encontre em uma pureza aceitável ou acima desta.

[00352] De acordo com esta estratégia, os primeiros conjuntos de partículas descritos acima são separados na população de partículas desejadas porque cada um destes conjuntos contém uma ou mais partículas apresentando uma característica A. Os terceiros conjuntos de partículas são também separados na população de partículas desejadas (aceitação coincidente), porque cada um destes conjuntos pode também conter uma ou mais partículas apresentando uma característica A, embora acompanhado por mais partículas apresentando a característica B. Por outro lado, os segundos conjuntos de partículas são rejeitados (por exemplo, não separados na população de partículas desejadas), porque eles não contêm uma partícula apresentando a característica desejada. Para otimizar a produtividade usando esta estratégia, o microprocessador aumenta a taxa de distribuição de fluido, contanto que a pureza da população coletada fique em um nível aceitável ou acima deste. Contrariamente afirmado, a taxa de distribuição de fluido é aumentada, contanto que o provável nível de contaminação da população de partículas desejada fique em um nível aceitável ou abaixo deste.

[00353] Como um exemplo, é considerado o uso de uma estratégia de controle de alta recuperação para separação de células de espermatozoide X e Y no fluxo de fluido da figura 78. O resultado desejado pode ser o de separar as células X em uma população de células X, contanto que a população permaneça em uma pureza aceitável ou acima desta, por exemplo, contanto que $X/(X+Y)$ seja maior que 85% ou algum outro nível aceitável. Para se obter este resultado, os primeiros conjuntos de partículas são separados em uma população de células

X porque eles contêm apenas uma ou mais células X. Os terceiros conjuntos de partículas são também separados na população de células X porque eles também contêm uma ou mais células X, mesmo que eles possam também conter uma célula Y(ou $\sim X$). Os segundos conjuntos de partículas são separados em outra população porque eles não contêm uma ou mais células X. Neste exemplo, a taxa na qual o sistema de distribuição de fluido distribui o fluido contendo as células no bocal continuaria a ser aumentada, já que a pureza da população das células X é maior que 85%. Contrariamente, se a pureza da população de células X cair abaixo de 85%, a taxa de distribuição de fluido será diminuída.

[00354] No contexto de um sistema de separação de gotícula, é sabido, a partir da equação de Poisson, que, para uma determinada taxa de geração de gotículas, o número de gotículas de múltiplas células irá aumentar à medida que a taxa de distribuição de célula aumenta. Em outras palavras, o aumento da taxa de distribuição de fluido contendo as células irá aumentar o número de gotículas de múltiplas células. Por isso, se a estratégia de separação de aceitação coincidente for usada e gotículas coincidentes contendo terceiros conjuntos de partículas forem separadas na população de partículas desejadas, o aumento da taxa de distribuição de fluido irá resultar em um decréscimo na pureza da população coletada porque nas taxas de distribuição de fluido mais altas estão sendo geradas e coletadas mais gotículas coincidentes. A figura 79 ilustra este resultado para um fluido de duas (2) partículas, de modo que 100% das partículas desejadas sejam capturados. Conforme mostrado, em taxas de distribuição de fluido muito baixas (FDR ao longo do eixo x), a pureza (eixo y) da população coletada resultante é muito alta porque muito poucas gotículas coincidentes contendo terceiros conjuntos de partículas estão sendo geradas e coletadas. À medida que a taxa de distribuição de fluido aumenta (a

FDR aumenta para a direita ao longo do eixo x), a porcentagem de gotículas coincidentes geradas aumenta, resultando em gotículas mais coincidentes que são coletadas e reduzindo a pureza da população utilizável (ao longo do eixo x). No exemplo específico ilustrado, a taxa de distribuição de fluido é de 30K partículas/segundo em cerca de 80% de pureza.

[00355] Os resultados de se usar uma estratégia de alta recuperação podem ser dramáticos, conforme ilustrado por um simples exemplo onde as células de esperma X e Y são separadas com o uso de um processo de separação de gotículas. É assumido, por exemplo, que as gotículas são geradas em uma taxa de 60K/s, e que as células de esperma são dispensadas na localização de interrogação em uma taxa de 30K/s. De acordo com a equação de Poisson, se todas as gotículas contendo células X forem separadas na população de células X, incluindo gotículas coincidentes contendo células X e Y, cerca de 15.000 células X serão coletadas a cada segundo. A população coletada irá incluir cerca de 2.600 células Y, reduzindo a pureza da população com relação às células X em cerca de 85,2%. Entretanto, o número de células X coletadas (15.000) representa um aumento substancial com relação a uma estratégia onde as gotículas coincidentes não são coletadas, como na estratégia ou modo de pureza elevada discutido abaixo. No modo de pureza elevada, a operação em uma frequência de 40K/s e a taxa de distribuição de célula de 40K/s (10K células/s mais do que no exemplo de modo de alta recuperação acima), apenas cerca de 11.800 células X são coletadas a cada segundo, ou cerca de 3.800 células X menos do que na estratégia de alta recuperação. Adicionalmente, quando a estratégia de pureza elevada for usada, cerca de 9.200 células X serão perdidas porque as gotículas coincidentes não são separadas na população de células X. Por isso, se menos do que 100% de pureza for aceitável, poderá ser desejável

usar o modo de alta recuperação para aumentar o número de células coletadas ou, contrariamente afirmado, para diminuir o número de células perdidas.

[00356] Em resumo, na estratégia de controle de alta recuperação usando a estratégia de separação de aceitação coincidente, a taxa de distribuição de partícula é inversamente relacionada à pureza da população coletada de partículas desejadas (às vezes, denominada de população "utilizável").

B. Estratégia de Controle de Pureza Elevada

[00357] Um segundo tipo de estratégia de controle pode ser denominado de estratégia de controle de "pureza elevada". O objetivo desta estratégia é o de manter a pureza da população coletada com relação às partículas apresentando uma característica desejada em nível alto, contanto que a quantidade de partículas desejadas na população coletada com relação ao número total de partículas desejadas no fluxo se encontre em uma quantidade aceitável ou acima desta (isto é, contanto que a quantidade de partículas desejadas no fluxo que não são coletadas permaneça abaixo de uma quantidade aceitável). De acordo com esta estratégia, os primeiros conjuntos de partículas descritos acima são separados na população de partículas desejadas porque cada um destes conjuntos contém uma ou mais partículas apresentando uma característica A desejada, e porque estes conjuntos não contêm quaisquer partículas contaminantes. Por outro lado, os segundos e terceiros conjuntos de partículas são separados em uma ou mais populações "inutilizáveis" (rejeição coincidente) porque eles contêm partículas contaminantes (isto é, partículas de característica B). Para otimizar a produtividade usando esta estratégia de "pureza elevada", o microprocessador aumenta a taxa de distribuição de fluido, contanto que a quantidade de partículas desejadas que são separadas na população utilizável com relação ao número total de partículas de-

sejadas disponíveis no fluxo permaneça em uma quantidade aceitável ou acima desta.

[00358] Como um exemplo, é considerado o uso de uma estratégia de controle de pureza elevada para a separação de células de esperma X e Y no fluxo de fluido da figura 78. O resultado desejado pode ser o de separar todas as células X em uma população de células X, contanto que a quantidade de células X coletadas do fluxo permaneça em uma quantidade aceitável ou acima desta, por exemplo, pelo menos 60%. Para se obter este resultado, os primeiros conjuntos de partículas são separados na população utilizável porque eles contêm uma ou mais células X. Por outro lado, os segundos e terceiros conjuntos de partículas são separados em uma ou mais populações inutilizáveis porque eles contêm uma ou mais células contaminantes ($\sim X$). Neste exemplo, a taxa na qual o sistema de distribuição de fluido distribui o fluido contendo as células no bocal continuaria a ser aumentada, contanto que a quantidade de células X coletadas na população utilizável como uma porcentagem de toda a quantidade disponível de células X que foram separadas permaneça em 60% ou acima disso. Contrariamente, se a quantidade de células X não-coletadas na população utilizável se elevar acima de 40% do número total de células X disponíveis que foram separadas, a taxa de distribuição de fluido será diminuída.

[00359] Conforme notado acima no contexto de um sistema de separação de gotículas, é sabido que o aumento da taxa de distribuição de fluido aumentará o número de gotículas de múltiplas células, e, portanto, o número de gotículas coincidentes contendo terceiros conjuntos de partículas. Uma vez que gotículas coincidentes não serão separadas na população de células X coletadas, quando do uso de uma estratégia de separação de rejeição coincidente, isto significa que o aumento da taxa de distribuição de fluido irá resultar em um aumento na quantidade de células X vivas perdidas para a população inutilizável.

[00360] A figura 80 ilustra este resultado para um fluido de duas (2) partículas, de modo que a população utilizável apresente 100% de pureza de partículas desejadas. Conforme mostrado, em taxas de distribuição de fluido muito baixas (a FDR ao longo do eixo x), a porcentagem de partículas desejadas na população utilizável é muito alta porque muito poucas gotículas coincidentes estão sendo geradas e rejeitadas. À medida que a taxa de distribuição de fluido aumenta (a FDR aumenta para a direita ao longo do eixo x), a porcentagem de gotículas coincidentes contendo terceiros conjuntos de partículas aumenta, sendo rejeitados muitos de tais conjuntos. Isto reduz a quantidade de partículas desejadas que são separadas na população utilizável com relação à quantidade total de partículas desejadas disponíveis no fluxo (isto é, a porcentagem de partículas desejadas originárias do fluxo que são coletadas na população utilizável). No exemplo específico ilustrado, a taxa de distribuição de fluido é de cerca de 40K de partículas/segundo e cerca de 75% das partículas desejadas são separadas na população coletada (isto é, alta pureza de partículas desejadas na população utilizável).

[00361] Em resumo, na estratégia de controle de pureza elevada que implementa a estratégia de separação de rejeição coincidente, a taxa de distribuição de partícula é inversamente relacionada à porcentagem das partículas desejadas na população coletada (isto é, a pureza elevada de partículas desejadas na população utilizável).

C. Estratégia de Controle de Taxa de Fluxo Constante

[00362] Um terceiro tipo de estratégia de controle pode ser denominado de estratégia de controle de taxa de fluxo constante. Nesta estratégia, o microprocessador mantém a taxa de distribuição de fluido constante (ou dentro de uma faixa constante) e varia a porcentagem de gotículas coincidentes coletadas (ou rejeitadas), contanto que a pureza de pelo menos uma população coletada esteja em um nível acei-

tável ou acima deste e contato que a quantidade de partículas desejadas nessa população esteja em uma quantidade aceitável com relação a uma quantidade total de partículas desejadas que foram processadas. Contrariamente afirmado, a taxa de distribuição de fluido é constante e a porcentagem de gotículas coincidentes aceitas (ou rejeitadas) varia, contanto que o provável nível de contaminação da população usável fique em um nível de pureza aceitável ou abaixo deste e contanto que a provável quantidade de partículas desejadas que é perdida para uma população diferente da população indicada (utilizável) esteja em uma quantidade aceitável ou abaixo desta.

[00363] Como um exemplo, é considerado o uso de uma estratégia de controle de taxa de fluxo constante para separar o fluxo de fluido mostrado na figura 78. O resultado desejado pode ser o de separar células de esperma X em uma população usável apresentando uma pureza de pelo menos 85% e de coletar pelo menos 60% das células X no fluxo, de modo que não mais do que 40% das células X sejam separados na população inutilizável. Neste exemplo, a taxa na qual o sistema de distribuição de fluido distribui as partículas seria mantida constante e a porcentagem de terceiros conjuntos de partículas coletadas ou rejeitadas (conjuntos coincidentes) seria variada, contanto que a pureza da população usável com relação às células X fosse igual ou maior que 85%, e contanto que a porcentagem de células X separadas na população inutilizável fosse menor que 40%, de modo que a porcentagem de partículas desejadas separadas na população utilizável fosse igual ou maior que 60% (estratégia de separação de aceitação coincidente variável). À medida que a porcentagem de terceiros jogos de partículas aumenta, a pureza da população utilizável diminui, embora a quantidade de partículas desejadas (por exemplo, células X) separadas na população inutilizável diminua. Contrariamente, à medida que a porcentagem de terceiros conjuntos de partículas

aceitas diminui, a pureza da população utilizável aumenta, embora a quantidade de partículas desejadas (por exemplo, células X) que são separadas na população inutilizável aumente.

[00364] Conforme notado acima, é sabido, a partir da equação de Poisson, que o número de gotículas de múltiplas células (e, portanto, o número de gotículas coincidentes contendo terceiros conjuntos de partículas) é constante para uma taxa de distribuição de fluido (célula) constante. Uma vez que o número de gotículas coincidentes é constante nesta estratégia de controle, a porcentagem de gotículas coincidentes separadas na população utilizável irá atingir tanto a pureza da população utilizável quanto a quantidade de células X que são perdidas com sua separação em uma população inutilizável. Isto se deve ao fato da porcentagem de células Y (ou $\sim X$) indesejadas nas gotículas coincidentes que são aceitas e separadas na população inutilizável coleada estar inversamente relacionada à porcentagem de células de esperma X em gotículas coincidentes que são rejeitadas e assim não separadas na população utilizável coletada.

[00365] A figura 81 ilustra a estratégia de controle de taxa de distribuição de fluido constante em um sistema e método de separação de gotículas de citometria de fluxo, conforme descrito aqui, implementando uma estratégia de separação de rejeição coincidente variável para um fluido de duas (2) partículas. Conforme mostrado, a linha OL ilustra a relação inversa entre a porcentagem de gotículas coincidentes rejeitadas (eixo x) comparada à porcentagem de gotículas coincidentes aceitas (eixo y). Quando houver uma porcentagem muito baixa de gotículas coincidentes aceitas, haverá uma porcentagem muito alta de gotículas coincidentes rejeitadas. Contrariamente, quando houver uma porcentagem muito alta de gotículas coincidentes, haverá uma porcentagem muito baixa de gotículas coincidentes rejeitadas. A linha OL ilustra esta relação inversa e representa a linha de operação da estra-

tégia de separação de aceitação coincidente variável em uma determinada taxa de fluxo de partícula constante. No ponto P na figura 81 ao longo da linha de operação OL, a pureza da população utilizável é uma determinada porcentagem dependendo da taxa de fluxo de partícula, por exemplo, 85% de pureza. À medida que a porcentagem de gotículas coincidentes aceitas aumenta (para a esquerda e para cima) ao longo da linha de operação OL, o número de partículas indesejadas que são separadas na população utilizável aumenta e a pureza cai abaixo de 85%, o que pode ser inaceitável. À medida que a porcentagem de gotículas coincidentes diminui (para a direita e para baixo) ao longo da linha de operação OL, a pureza sobe para 85% e é aceitável.

[00366] No ponto LL ao longo da linha de operação OL, 75% das gotículas coincidentes são rejeitadas (isto é, separadas na população inutilizável), de modo que a porcentagem de partículas desejadas que são perdidas com a separação na população inutilizável seja uma determinada porcentagem com base na taxa de distribuição de partícula, por exemplo, 40%. À medida que a porcentagem de gotículas coincidentes rejeitadas aumenta (para a direita e para baixo) ao longo da linha de operação OL, a porcentagem de partículas desejadas que são separadas na população utilizável diminui (por exemplo, para <60%), o que pode ser inaceitável. À medida que a porcentagem de gotículas coincidentes rejeitadas diminui (para a esquerda e para cima) ao longo da linha de operação OL, a porcentagem de partículas desejadas separadas na população utilizável aumenta (por exemplo, para >60%), o que é aceitável. Portanto, de acordo com este aspecto da invenção, para uma estratégia de controle de taxa de fluxo constante que implementa uma estratégia de separação de aceitação coincidente variável, o microprocessador pode operar o sistema, de modo que a porcentagem de gotículas coincidentes aceitas e rejeitadas varie em uma faixa de operação entre o ponto P1 e LL, conforme indicado pela seta OR. É

notado que a faixa de operação OR pode abranger mais ou menos da linha de operação, dependendo do nível de tolerância para impureza e perda de partículas desejadas para a população inutilizável.

[00367] Em resumo, na estratégia de controle de taxa de fluxo constante que usa a estratégia de separação de aceitação coincidente variável, a porcentagem de terceiros conjuntos de partículas que são aceitas está inversamente relacionada à pureza da população utilizável e inversamente relacionada à quantidade de partículas desejadas perdidas com a separação em uma população inutilizável.

D. Sumário de Estratégias de Controle

[00368] A seguinte Tabela sumariza as estratégias de controle indicadas acima.

ESTRATÉGIA DE CONTROLE	ALTA RECUPERAÇÃO	PUREZA ELE-VADA	TAXA DE FLUXO CONSTANTE
Parâmetro controlado	Taxa de distribuição de fluido	Taxa de distribuição de fluido	Parâmetros de separação
Parâmetro de controle	População de pureza	Quantidade de partículas desejadas em população	Pureza da população quantidade de partículas desejadas em população
Estratégia de separação	Aceitação coincidente	Rejeição coincidente	Aceitação coincidente variável
Estratégia de separação X/Y	Coletar gotículas X e gotículas X+~X; rejeitar gotículas ~X	Coletar gotículas X; rejeitar gotículas X+~X e gotículas ~X	Coletar gotículas X; variar porcentagem de gotículas X+~X coletadas; rejeitar gotículas ~X
Definição	A taxa de distribuição de fluido é aumentada, contanto que a pureza da população com relação às partículas X fique em um nível aceitável ou acima deste.	A taxa de distribuição de fluido é aumentada, contanto que a quantidade de partículas desejadas na população utilizável com relação à quantidade total de partículas X no fluxo esteja em uma quantidade	A porcentagem de gotículas coincidentes na população é aumentada, contanto que a pureza da população com relação às partículas X esteja em um nível aceitável ou acima deste; para continuar a operação, a quantidade de partículas desejadas na população utilizável com relação à população utili-

ESTRATÉGIA DE CONTROLE	ALTA RECUPERAÇÃO	PUREZA ELE-VADA	TAXA DE FLUXO CONSTANTE
		aceitável ou acima desta	zável com relação à quantidade total de partículas X no fluxo tem que estar em uma quantidade aceitável ou acima desta
Definição contrária	A taxa de distribuição de fluido é aumentada, contanto que a probabilidade de contaminação da população utilizável fique em um nível de pureza aceitável ou abaixo deste.	A taxa de distribuição de fluido é aumentada, contanto que a probabilidade de perda da quantidade de partículas desejadas em uma população inutilizável esteja em uma quantidade aceitável ou baixo desta	A taxa de distribuição de fluido é aumentada, contanto que a probabilidade de contaminação da população utilizável esteja em um nível aceitável ou abaixo deste de pureza E, contanto que a probabilidade de perda da quantidade de partículas desejadas na população inutilizável esteja em uma quantidade aceitável ou abaixo desta

Continuação...

Resultado desejado	> pureza aceitável mínima; por exemplo, >85% de pureza.	> quantidade aceitável mínima; por exemplo, >60% das partículas desejadas capturadas (<40% de partículas desejadas perdidas)	> pureza aceitável mínima e > quantidade aceitável mínima; por exemplo, > 85% de pureza e > 60% de partículas desejadas capturadas (< 40% de partículas desejadas perdidas)

[00370] Associadamente, uma amostra separada obtida com o uso de uma das estratégias de controle acima pode ser combinada com uma segunda amostra para se obter uma amostra final (por exemplo, comercial) apresentando as características desejadas. Por exemplo, uma amostra separada de acordo com a estratégia de pureza elevada para produzir uma população 100% pura pode ser combinada com uma população de volume igual separada para 80% de pureza para produzir uma amostra final apresentando uma pureza de 90%. Ou, no caso de esperma animal separado para uma pureza elevada, uma

quantidade fracional do esperma separado pode ser combinada com uma quantidade fracional do esperma não-separado para produzir uma amostra final de pureza desejada em custo inferior do que separar toda a quantidade de esperma usando qualquer dos métodos de separação acima.

[00371] A descrição acima das estratégias de controle assume a identificação precisa e a separação de cada gotícula incluindo cada gotícula coincidente. Na prática, 100% de precisão não são possíveis por inúmeras razões. A fim de minimizar a contaminação, portanto, pode ser desejável rejeitar partículas que não possam ser classificadas com segurança como pertencentes à população desejada. Por outro lado, se certas partículas puderem ser identificadas e classificadas como estando na população desejada dentro de uma certa probabilidade selecionada (por exemplo, maior do que 50% no caso de células de esperma), poderá ser desejável classificar as partículas como pertencentes à população desejada, de modo que elas não sejam perdidas para a população inutilizável. Dessa forma, conforme discutido anteriormente, partículas, tais como células de esperma, podem ser aceitas ou rejeitadas para separação em uma população de células desejadas com base na probabilidade de tais partículas pertencerem à população utilizável.

[00372] Os termos "utilizável" e "inutilizável", conforme usados na tabela acima e nesta aplicação, são usados por conveniência apenas e não se destinam a ser de forma alguma limitativos. Assim, uma população "utilizável" inclui qualquer "primeira" população, não obstante como ou se ela é usada, e uma população "inutilizável" inclui qualquer "segunda" população diferente da população utilizável, não obstante como ou se ela é usada. Similarmente, uma população "desejada" indica qualquer população que seja separada de acordo com as características de partículas desejadas.

[00373] O microprocessador e seu software de processamento de sinal constituem um sistema para processar os sinais elétricos originários do fotodetector para classificar partículas (por exemplo, partículas, em geral, e partículas de esperma, em particular), de acordo com as características das partículas e para se obter informação relacionada à distribuição das partículas, conforme descrito acima com relação à figura 78. Adicionalmente, o microprocessador constitui um sistema de controle responsivo ao software de processamento de sinal para variar a taxa na qual o sistema de distribuição de fluido distribui partículas no sistema de bocal como uma função da informação obtida referente à distribuição das partículas. Adicionalmente, o microprocessador constitui um sistema de controle responsivo ao software de processamento de sinal para variar a estratégia de classificação como uma função da informação obtida relacionada à distribuição das partículas.

[00374] Em geral, o microprocessador constitui um sistema de controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de separação para variar sua estratégia de separação ou para controlar o sistema de distribuição de fluido. Em outras palavras, o microprocessador é capaz de operar em um primeiro modo para variar a estratégia de separação, é capaz de operar em um segundo modo para controlar o sistema de distribuição de fluido, é capaz de operar em um terceiro modo para variar a estratégia de separação e para controlar o sistema de distribuição de fluido, podendo, inclusive, ser capaz de operar em outros modos. Quando da operação no primeiro ou no terceiro modo, o microprocessador é capaz de variar a taxa na qual o fluido é distribuído como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma população com relação às partículas de característica A ou às partículas de característica B, e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma população com

relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no fluxo.

SISTEMA DE COLETA

[00375] Um sistema de coleta é necessário para coletar as gotículas depois que elas passam entre as placas defletoras. O sistema de coleta para um citômetro convencional pode ser não mais do que vasos de coleta dispostos para capturar as gotículas nos vários fluxos de gotículas depois que elas passam entre as placas defletoras. Sistemas de coleta convencionais podem ser usados em algumas concretizações da presente invenção.

[00376] Entretanto, pode ser difícil usar um sistema de coleta convencional em concretizações da presente invenção, no qual o bocal é orientado para direcionar o fluxo de fluido em um ângulo ascendente, proporcionando assim às gotículas um componente de velocidade horizontal. Uma questão é a de que gotículas percorreriam alguma distância horizontal ao longo de suas trajetórias na forma de arco antes que elas comessem o movimento descendente que seria adequado para o pouso em um vaso de coleta. Por exemplo, se o bocal estiver apontado para cima em uma faixa de 45° a 60° e as gotículas saírem em uma velocidade entre 15 m/s e 20 m/s, as gotículas estarão em uma distância horizontal de vários metros longe do bocal antes que elas alcancem o ápice de suas trajetórias e comecem o movimento descendente. Assim, uma boa parte do espaço de laboratório seria ocupada pelos fluxos de gotículas. Adicionalmente, em uma faixa de vários metros, poderia também ser difícil assegurar o pouso das gotículas nos vasos de coleta adequados. As trajetórias dos fluxos de gotículas pode mudar toda vez que uma ou mais condições de operação para o citômetro mudarem (por exemplo, o ajuste da taxa de distribuição de fluido em uma mudança na velocidade de fluido no orifício de bocal). Mudanças nas trajetórias dos fluxos de gotículas serão aumen-

tadas pela distância que as gotículas percorrem. Portanto, mudanças nas trajetórias que não resultam em uma mudança apreciável na localização de gotículas em um ponto relativamente próximo do bocal poderiam resultar em uma mudança significativa na localização das gotículas em uma localização que está mais afastada do bocal. Conforme discutido acima, algumas concretizações da presente invenção empregam a realimentação para os sistemas de formação de gotículas e/ou de distribuição de fluido de amostra que poderiam resultar em fluxos de gotículas que constantemente alteram suas trajetórias. Pode-se também desejar variar a pressão na qual o fluido de revestimento é dispensado no bocal. Correntes de ar, variações de temperatura, e variações de umidade poderiam também alterar as trajetórias dos fluxos de gotículas. Qualquer fator que pudesse alterar a trajetória dos fluxos de gotículas poderia também exigir que os vasos de coleta fossem reposicionados, de modo que as gotículas pousassem em vasos de coleta apropriados. Em contraste, as trajetórias de fluxos de gotículas em um citômetro convencional apresentando um bocal apontando para baixo são menos suscetíveis à variação. Por exemplo, o fato dos fluxos de gotículas apresentarem uma velocidade inicial substancialmente descendente significa que a variação na velocidade de fluido no orifício não resulta em qualquer variação significativa nas trajetórias. Adicionalmente, os vasos de coleta estão relativamente próximos do bocal, o que torna o sistema de coleta mais tolerante às variações de trajetória nos fluxos de gotículas.

[00377] As figuras 83-85 mostram uma concretização de um sistema de coleta, geralmente indicado por 2201, que pode ser usado para coletar gotículas separadas em um sistema da presente invenção. O sistema de coleta será particularmente adequado para a coleta de gotículas 33, quando o sistema de bocal de citômetro 101 for orientado para direcionar o fluxo de fluido 21 em um ângulo ascendente ou em

qualquer outro ângulo apresentando um componente horizontal. À medida que as gotículas passam entre as placas defletoras 629, elas são separadas em múltiplos fluxos de gotículas 123, 125 (por exemplo, dois) apresentando diferentes trajetórias na forma de arco. Conforme mostrado nas figuras 84 e 85, a trajetória de cada fluxo de gotícula é conduzida para um de dois dispositivos de interceptação de gotícula 2203. Se as gotículas estiverem sendo separadas em mais de dois fluxos de gotículas, um dispositivo de interceptação separado precisará ser provido para cada fluxo de gotícula adicional. Desse modo, o número de dispositivos de interceptação em um sistema de coleta da presente invenção irá depender do número de fluxos nos quais as gotículas estão sendo separadas.

[00378] Cada dispositivo de interceptação 2203 no sistema de coleta exemplificativo apresenta uma superfície de impacto 2205 posicionada para se estender sobre a trajetória de um dos fluxos de gotículas para desviar as gotículas que se movem ao longo dessa trajetórias para um vaso de coleta 2207 posicionado abaixo de cada dispositivo de interceptação. As superfícies de impacto são preferivelmente formadas de um material flexível. Sem ligação a qualquer teoria, acredita-se que os materiais flexíveis amortecem o impacto das gotículas que atingem a superfície do dispositivo de interceptação, reduzindo assim os danos às partículas (por exemplo, as células de esperma) nas gotículas. Por exemplo, os dispositivos de interceptação podem ser construídos de polipropileno, polietileno, ou outros polímeros similares. Com referência às figuras 86 e 87, os dispositivos de interceptação 2203 foram construídos como o corte de uma passagem de entrada de gotícula 2211 (por exemplo, janela retangular) em um lado do bulbo 2213 de uma pipeta 2215. Desse modo, uma porção da parede interna 2217 do bulbo oposta à passagem de entrada de gotículas forma uma superfície de impacto curvada 2205 que se estende sobre a trajetória do res-

pectivo fluxo de gotículas. Convenientemente, o tubo da pipeta serve como uma guia 2225 para direcionar o fluxo da superfície de impacto para o vaso de coleta.

[00379] Com referência à figura 84, os dispositivos de interceptação são presos a uma armação de sistema de coleta 2227 que os prende no lugar. A fim de considerar a variabilidade nas trajetórias dos fluxos de gotículas, é desejável permitir o ajuste das posições dos dispositivos de interceptação. Por exemplo, a altura vertical de cada dispositivo de interceptação pode ser ajustada com o deslizamento do tubo de guia para cima e para baixo em um furo circular através de um suporte 2229. Quando o dispositivo de interceptação estiver na altura desejada, um parafuso de ajuste 221 poderá ser apertado para mantê-lo nessa altura. O suporte pode ser conectado a uma placa de montagem 2233 que é conectada à armação do sistema de coleta, por exemplo, por parafusos de ajuste 2235 (por exemplo, dois parafusos de ajuste). Os parafusos de ajuste 2235 passam através de uma fenda horizontal 2241 na placa de montagem para permitir o ajuste lateral do dispositivo de interceptação. Depois do ajuste, os parafusos de ajuste podem ser apertados para prender o suporte circular na localização desejada. Aqueles versados na técnica irão reconhecer que uma variedade de outros dispositivos de fixação poderia ser usada para ajustar a posição do dispositivo de interceptação sem se afastar do escopo da presente invenção. Os vasos de coleta 2207 são mantidos abaixo dos dispositivos de interceptação nas fendas 2241 em uma bandeja 2243 para deter os vasos de coleta. Assim, cada vaso de coleta pode ser movido com uma respectiva fenda, conforme necessário, para que ele permaneça em posição sob o respectivo dispositivo de interceptação. Também um banho de água (não-mostrado) pode ser provido em torno do vaso de coleta, caso desejado, para controlar a temperatura dos conteúdos do vaso de coleta.

[00380] Com referência à figura 85, em uma concretização da presente invenção, uma janela de saída 2245 (por exemplo, uma janela retangular) foi cortada na parte detrás de um dos dispositivos de interceptação 2247 para permitir que um ou mais fluxos de gotículas passem através do dispositivo de interceptação. Um segundo dispositivo de interceptação 2249 é posicionado atrás da janela de saída para interceptar as gotículas que passam através desta janela. Uma janela de entrada exemplificativa para o segundo dispositivo de interceptação pode ser aproximadamente do mesmo tamanho que a janela de saída exemplificativa para o primeiro dispositivo de interceptação. Por razões que se tornarão evidentes, é desejável que a janela de saída seja significativamente menor que a janela de entrada para o primeiro dispositivo de interceptação. Por exemplo, uma janela de entrada exemplificativa para o primeiro dispositivo de interceptação tem cerca de 15,875 mm (5/8 de polegada) de altura e cerca de 9,525 mm (3/8 polegada) de largura. Em contraste, uma janela de saída exemplificativa pode ter 3,175 mm (1/8 de polegada) de altura e 7,938 mm (5/16 de polegada) de largura.

[00381] Durante a operação do citômetro, o sistema de coleta opera para interceptar as gotículas nos fluxos separados. As gotículas interceptadas são então drenadas através dos tubos de guia 2225 dos dispositivos de interceptação 2203 e para os vasos de coleta 2207. No caso de um citômetro apresentar um bocal de citômetro apontando para cima que direciona os fluxos de gotículas ao longo de trajetórias na forma de arco, por exemplo, os dispositivos de interceptação permitirão que as gotículas sejam interceptadas em um ponto em sua trajetória que esteja significativamente mais próximo do bocal em comparação com o ponto no qual as gotículas seriam coletadas por um sistema de coleta convencional (isto é, um sistema de coleta sem dispositivos de interceptação).

[00382] A interceptação dos fluxos de gotículas relativamente cedo ao longo de suas trajetórias na forma de arco (por exemplo, enquanto eles estão se movendo para cima) reduz o grau de variação na localização das gotículas no momento em que as gotículas encontram primeiramente o sistema de coleta. Conseqüentemente, o sistema de coleta pode tolerar mais variação nas trajetórias dos fluxos de gotículas do que um sistema de coleta convencional poderia tolerar. Similarmente, as gotículas são menos propensas a serem atingidas pelas correntes de ar por causa de seus percursos mais curtos para o sistema de coleta.

[00383] Um equilíbrio terá que ser atingido entre mover os dispositivos de interceptação 2203 para mais próximo do bocal 101 para aumentar a tolerância para as variações de trajetória e mover os dispositivos de interceptação para mais longe do que o orifício de bocal para reduzir ou minimizar a força de impacto, quando as gotículas atingirem os dispositivos de interceptação, como com o posicionamento dos dispositivos de interceptação, de modo que eles interceptem os fluxos de gotículas substancialmente no ápice de suas trajetórias. Conseqüentemente, a melhor localização para os dispositivos de interceptação irá depender da durabilidade das partículas (por exemplo, células de espermatozoide) que são separadas, das velocidades das gotículas, e da magnitude esperada de variação nas trajetórias de fluxo de gotículas. No caso de gotículas contendo células de espermatozoide bovino apresentando uma velocidade no orifício de bocal de cerca de 16 a 20 m/s, por exemplo, os dispositivos de interceptação podem ser posicionados na faixa de 101,6 - 152,4 mm (4 - 6 polegadas) a partir do orifício de bocal. Na concretização na qual um primeiro dispositivo de interceptação apresenta uma janela de saída e um segundo dispositivo de interceptação é posicionado atrás do primeiro dispositivo de interceptação, por exemplo, o primeiro dispositivo de interceptação poderá estar na faixa

de cerca de 101,6 a 127 mm (4 e 5 polegadas) a partir do bocal. Mais desejavelmente, o primeiro dispositivo de interceptação se encontra a cerca de 114,3 mm (4,5 polegadas) a partir do bocal. O segundo dispositivo de interceptação pode estar na faixa de 127 a 152,4 mm (5 a 6 polegadas) a partir do bocal. Mais desejavelmente, o segundo dispositivo de interceptação está a cerca de 139,7 mm (5,5 polegadas) a partir do bocal.

[00384] A configuração na qual um dispositivo de interceptação 2203 é posicionado para interceptar as gotículas que passam através de uma janela de saída de outro dispositivo de interceptação será particularmente vantajosa, quando a pureza de uma das populações separadas (por exemplo, o esperma conduzindo cromossomos Y no caso de esperma separado para uso em criação de gado leiteiro) não representar uma preocupação. Aqueles versados na técnica irão saber que inúmeras gotículas de dispersão 2265 (por exemplo, uma névoa de gotículas de dispersão) apresentando teores desconhecidos podem ser produzidas pelo citômetro além das gotículas nos fluxos separados, conforme mostrado na figura 85. O primeiro dispositivo de interceptação deve ser posicionado de modo que o fluxo de gotículas que estão sendo separadas na população para a qual há uma maior tolerância para impurezas atinja a superfície de impacto 2205 do primeiro dispositivo de interceptação e o fluxo para o qual a pureza é a mais crítica passe através da janela de saída 2245 para atingir a superfície de impacto do segundo dispositivo de interceptação. Dessa forma, a maior parte das gotículas de dispersão é coletada no vaso de coleta 2207 contendo a população para a qual a pureza representa uma menor preocupação, conforme mostrado na figura 85, e não contaminará a população para a qual a pureza é crítica. Também, com a interceptação e a coleta das gotículas de dispersão, evita-se a necessidade de limpar tão freqüentemente quanto como se as gotículas de dispersão

escapassem do sistema de coleta. Em contraste ao primeiro dispositivo de interceptação, o segundo dispositivo de interceptação apenas desvia as gotículas que passam através da janela de saída menor. Isto facilita a manutenção da pureza da população coletada pelo segundo dispositivo de interceptação.

[00385] Aqueles versados na técnica irão reconhecer que o sistema de coleta exemplificativo poderia ser prontamente modificado em inúmeras maneiras sem se afastar do escopo da presente invenção. Por exemplo, seria possível construir um dispositivo de interceptação de gotículas apresentando um vaso de coleta integralmente formado (ou de outra maneira conectado) abaixo dele, sem se afastar do escopo desta invenção. Similarmente, embora os dispositivos de interceptação na concretização mostrada nas figuras 83-87 sejam pipetas modificadas, é entendido que os dispositivos de interceptação 2203 possam ter qualquer de uma variedade de formas sem se afastar do escopo desta invenção. Por exemplo, cada dispositivo de interceptação pode compreender uma forma de folha chata ou curvada, de uma colher, de uma tigela, ou outra forma similar. A única exigência é a de que o dispositivo de interceptação seja operável para interceptar gotículas que se movem ao longo de uma respectiva trajetória de um fluxo de gotículas para desviar as gotículas interceptadas para um vaso de coleta. Entretanto, uma vantagem de se construir os dispositivos de interceptação a partir de um produto prontamente disponível e relativamente econômico, tal como uma pipeta, é a de que pode ser mais econômico substituir ou descartar os dispositivos de interceptação usados depois de cada corrida de amostra do que limpar os dispositivos de interceptação entre as corridas de amostra. Isto poderia ajudar a reduzir os custos de operação do sistema de coleta.

FLUIDO DE COLETA

[00386] Os espermatozoides separados são coletados em um vaso que

contém um fluido de coleta 2301 (figuras 56 e 57). Geralmente, a finalidade do fluido de coleta inclui o amortecimento do impacto das células de esperma com o vaso de coleta ou a provisão de um suporte de fluido para as células. Consistente com estas considerações, o fluido de coleta pode compreender um tampão ou uma solução tampão e uma fonte de proteína.

[00387] Caso incluídos, os exemplos de tampões ou soluções tampões que podem ser usados no fluido de coleta são descritos acima com relação à coleta e diluição de amostra. Tipicamente, estes tampões ou soluções tampão estarão em uma concentração de cerca de 0,001M a cerca de 1,0M e apresentam um pH de cerca de 4,5 a cerca de 8,5, preferivelmente de cerca de 7,0. Em uma concretização, o fluido de coleta contém tampão compreendendo 0,96% de PBS de Dulbecco (p/v) em um pH de cerca de 7,0. Em outra concretização, o fluido de coleta contém um inibidor metabólico que compreende 0,204 g de NaHCO_3 , 0,433 g de KHCO_3 e 0,473 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 25 mL de água purificada (0,097 mol/L de NaHCO_3 , 0,173 mol/L de KHCO_3 , 0,090 mol/L de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em água).

[00388] Caso incluída, a fonte de proteína pode ser qualquer fonte de proteína que não interfira com a viabilidade das células de esperma e que seja compatível com o tampão ou solução tampão específica que é usada. Exemplos de fontes de proteína comuns incluem o leite (incluindo leite homogeneizado por calor e leite desnatado), extrato de leite, gema de ovo, extrato de gema, proteína de soja e extrato de proteína de soja. Tais proteínas podem ser usadas em uma concentração de cerca de 1% (v/v) a cerca de 30% (v/v), preferivelmente de cerca de 10% (v/v) a cerca de 20% (v/v), e mais preferivelmente de cerca de 10% (v/v). Enquanto o leite pode ser usado em combinação com um tampão ou solução tampão, o leite, em geral, é usado na ausência dos mesmos, à medida que o leite é uma solução que pode atender a

mesma finalidade de um tampão ou solução tampão. Em tal exemplo, o fluido de coleta pode conter cerca de 80% (v/v) a cerca de 90% (v/v) de leite.

[00389] Além da fonte de proteína ou no lugar desta, o fluxo de coleta pode também compreender plasma seminal. O plasma seminal serve a benefícios duplos de aperfeiçoar a viabilidade a motilidade do esperma e de estabilizar a membrana do esperma (impedindo assim a capacitação durante a coleta e o armazenamento do esperma). Maxwell e outros *Reprod. Fert. Dev.* (1988) 10:433-440. O plasma seminal pode se originário do mesmo mamífero a partir do qual foi obtida a amostra de sêmen, de um mamífero diferente da mesma espécie, ou de um mamífero de uma espécie diferente. Caso incluída no fluido de coleta, tipicamente a porcentagem do plasma seminal estará na faixa de cerca de 0,5% (v/v) a cerca de 10% (v/v). Caso usada em combinação com uma fonte de proteína, tal como, por exemplo, gema de ovo ou leite, a porcentagem total de plasma seminal ou fonte de proteína irá variar de cerca de 1% (v/v) a cerca de 30% (v/v). Em tais exemplos, a porcentagem de plasma seminal será inversamente proporcional à porcentagem da fonte de proteína. Conseqüentemente, em uma concretização, o fluido de coleta compreende plasma seminal. Em outra concretização, o fluido de coleta contém plasma seminal em uma quantidade de cerca de 0,5% (v/v) a cerca de 10% (v/v), preferivelmente em uma quantidade de cerca de 4% (v/v) a cerca de 6% (v/v), e mais preferivelmente em uma quantidade de cerca de 5% (v/v). Em outra concretização, o fluido de coleta contém uma fonte de proteína e plasma seminal. Em ainda outra concretização, o fluido de coleta compreende plasma seminal e gema de ovo, a porcentagem de ambos totalizando entre cerca de 1% (v/v) e cerca de 30% (v/v).

[00390] Opcionalmente, o fluido de coleta pode também conter uma faixa de aditivos que são benéficos para a viabilidade ou motilidade de

esperma. Exemplos de tais aditivos incluem uma fonte de energia, um antibiótico, e uma composição que regula as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou extracelularmente, cada um dos quais é discutido acima com relação à coleta e diluição de amostra. Tais aditivos podem ser acrescentados ao fluido de coleta de acordo com o mesmo.

[00391] Conseqüentemente, em certa concretização, o fluido de coleta compreende PBS de Dulbecco(p/v), 1% (p/v) de frutose, 10% (v/v) de gema de ovo na água, em um pH de cerca de 7,0. Em ainda outra concretização, o fluido de coleta adicionalmente compreende 10mM de piruvato, 100 M de vitamina K, ou 1mM de ácido lipóico.

[00392] Alternativamente, e no lugar de usar um fluido de coleta, as células separadas podem ser coletadas em um vaso contendo ou revestido com um crioextensor usado nas etapas de criopreservação subseqüentes e descrito adicionalmente abaixo. Conseqüentemente, em uma concretização específica, as células separadas são coletadas em um crioextensor. Em outra concretização, as células coletadas são separadas em um crioextensor compreendendo água, Triladyl® (Minitubo, Verona, W1, compreendendo glicerol, tris, ácido cítrico, frutose, 5mg/100 ml de tilosina, 25mg/100ml de gentamicina, 30mg/100ml de Espectinomicina, e 15mg/100ml de Lincomicina), gema de ovo, e ácido pirúvico. Em ainda outra concretização, o fluido de coleta é o crioextensor que compreende 25g de Triladyl®, 25g de gema de ovo, e 10mM de ácido pirúvico em 75mL de água.

[00393] Deve ser entendido que as concentrações percentuais de proteína no fluido de coleta descrito aqui são aquelas antes da adição das células separadas do fluxo. A adição das células separadas do fluxo irá diluir a concentração final do fluido de coleta a cerca de 1/20 que era antes da adição das células separadas do fluxo. Por isso, por exemplo, o fluido de coleta pode inicialmente conter cerca de 10%

(v/v) de gema de ovo. Depois que as células separadas de fluxo são coletadas no vaso de coleta contendo o fluido de coleta, a concentração final da gema de ovo será reduzida para cerca de 0,5% (v/v).

PRÉ-TRATAMENTO DE DISPOSITIVOS DE INTERCEPTAÇÃO E/OU VASOS DE COLETA

[00394] A fim de minimizar o possível dano às partículas (por exemplo, células de espermatozoides) que podem ser separadas de acordo com a presente invenção, os dispositivos de interceptação 2203 e/ou vasos de coleta 2207 (figuras 56-60) podem ser tratados antes do uso. Tal pré-tratamento pode compreender, por exemplo, o contato ou embebedimento dos dispositivos de interceptação e dos vasos de coleta em um banho contendo uma composição que irá servir para minimizar o impacto entre a partícula e o dispositivo de interceptação. Com a remoção dos dispositivos de interceptação e dos vasos de coleta do banho, uma certa quantidade da composição irá permanecer nos dispositivos de interceptação e nos vasos de coleta e servir como um agente de amortecimento para as partículas nas gotículas. A composição, portanto, deve ter características adequadas para prover o efeito de amortecimento desejado. Além disso, a composição deve também ser compatível com as partículas ou célula que é separada, o fluido de revestimento, e o fluido de coleta. Consistente com estas considerações, a composição usada para tratar os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta pode compreender um tampão ou uma solução tampão, um fluido de revestimento, um fluido de coleta, um crioprotetor, quaisquer componentes contidos na solução tampão, no fluido de revestimento, no fluido de coleta, ou no crioprotetor, ou em qualquer combinação dos mesmos. Tampões, soluções tampões, fluidos de revestimento, e fluidos de coleta usados para o tingimento e a separação de células de espermatozoides de acordo com os métodos da presente invenção são descritos acima. Conseqüentemente, em uma concretização,

os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta são contactados com fluido de revestimento (por exemplo, embebidos ou limpos com fluido de revestimento). Em outra concretização, os dispositivos de interceptação e vasos de coleta são contactados com fluido de coleta. Em ainda outra concretização, os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta são contactados com um crioextensor descrito abaixo.

[00395] O contato ou o embebimento dos dispositivos de interceptação e dos vasos de coleta com a composição preferivelmente ocorre por um período de tempo suficiente para permitir que a composição seja aderida às superfícies dos dispositivos de interceptação e dos vasos de coleta. Tal período de tempo é geralmente menor que cerca de 90 minutos, preferivelmente menor que cerca de 60 minutos, mais preferivelmente de cerca de 30 a 60 minutos, e mais preferivelmente de cerca de 60 minutos. Em ainda outra concretização, os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta são meramente contactados com a composição antes do uso.

[00396] No lugar ou em combinação com o contato dos dispositivos de interceptação e dos vasos de coleta com a composição acima descrita, os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta podem também ser contactados com componentes específicos contidos no fluido de revestimento, no fluido de coleta, e/ou no crioextensor, tal como, por exemplo, BSA, SSS, gema de ovo, extrato de gema de ovo, leite (incluindo leite homogeneizado por calor e leite desnatado), extrato de leite, proteína de soja, e extrato de proteína de soja. Conseqüentemente, em uma concretização, os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta são contactados com fluido de revestimento e subseqüentemente contactados com 0,1% (v/v) de albumina de soro bovino. Em outra concretização, os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta são contactados com fluido de revestimento e subseqüentemente contactados com 10% (v/v) de gema de ovo. Em outra concreti-

zação, os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta são embebidos em fluido de coleta e subsequente contactados com 0,1% (v/v) de albumina de soro bovino. Em outra concretização, os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta são embebidos em fluido de coleta e subsequente contactados com 10% (v/v) de gema de ovo.

[00397] Embora os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta recebam o mesmo pré-tratamento em cada concretização descrita acima, é possível usar diferentes protocolos de pré-tratamento para os dispositivos de interceptação e os vasos de coleta sem se afastar do escopo desta invenção. Do mesmo modo, alguns dos dispositivos de interceptação ou vasos de coleta poderiam receber um pré-tratamento e outros dos dispositivos de interceptação ou vasos de coleta poderiam receber um pré-tratamento diferente sem se afastar do escopo desta invenção. Certas vantagens do pré-tratamento podem também ser obtidas com o pré-tratamento apenas dos dispositivos de interceptação ou apenas dos vasos de coleta, novamente sem se afastar do escopo desta invenção.

CONCENTRAÇÃO

[00398] Conforme notado acima, o esperma separado coletado pelo citômetro de fluxo foi diluído com a adição de vários tampões ou extensores, do fluido de tingimento, do fluido de revestimento, e do fluido de coleta. Tipicamente, a concentração das células de esperma depois da separação pela citometria de fluxo, conforme descrito acima, está na faixa de cerca de $0,7 - 1,4 \times 10^6$ células de esperma/ml. Por isso, é importante concentrar as células de esperma separadas para minimizar o choque de diluição para o esperma e para se conseguir a concentração adequada de esperma para criopreservação e inseminação artificial. A prática padrão na indústria de criação de animais, por exemplo, é a de executar a inseminação artificial com esperma em

uma concentração de cerca de 20×10^6 ou cerca de 40×10^6 de células de esperma/ml. Uma maneira de concentrar as células de esperma é através da centrifugação do fluido coletado pelo citômetro. Outro modo para concentrar o esperma é o de passar o fluido coletado pelo citômetro através de um sistema de filtração. Estes processos são discutidos em maiores detalhes abaixo.

A. Centrifugação

[00399] Qualquer centrífuga convencional pode ser usada para concentrar esperma. Entretanto, em uma operação comercial, é preferível usar uma centrífuga apresentando a capacidade de centrifugar uma grande batelada de células de esperma de uma vez. Durante a centrifugação, a maioria das células de esperma será coletada em um pélete no fundo do tubo da centrífuga devido à força centrífuga que atua sobre as células de esperma. A magnitude da força centrífuga é convencionalmente indicada como o número de vezes em que a força centrífuga excede a força gravitacional. Devido ao fato da força centrífuga ser o parâmetro crítico e devido ao fato da magnitude da força centrífuga em qualquer velocidade determinada (velocidade angular) variar dependendo do comprimento do raio de curvatura, a velocidade de centrifugação será tipicamente especificada pela indicação da magnitude da força centrífuga. Por exemplo, uma força de 600g indica que a velocidade angular da centrífuga é selecionada de modo que a força centrífuga resultante venha a ser 600 vezes a força de gravidade. A maior parte dos fluidos e de quaisquer células de esperma que escapam que é centrifugada no pélete estará no sobrenadante. Geralmente, o sobrenadante é removido e as células de esperma no pélete são novamente suspensas para processamento adicional, conforme descrito abaixo. É importante maximizar a porcentagem de esperma que é concentrada no pélete, enquanto ao mesmo tempo minimiza o prejuízo para as células de esperma.

[00400] De acordo com um processo da presente invenção, um tubo de centrifugação contendo cerca de 10×10^6 de células de esperma separadas é colocado em uma centrífuga. Para facilitar a concentração, os tubos de centrifugação podem ser usados como os vasos de coleta no sistema de coleta do citômetro. Isto impede a necessidade de transferir as células de esperma separadas para um tubo de centrifugação antes da centrifugação. O tubo é centrifugado em uma velocidade e por uma duração que é suficiente para fazer com que um pélete de células de esperma concentradas seja formado no fundo do tubo. A velocidade e a duração da centrifugação é desejavelmente selecionada em consideração de diversos fatores, incluindo: o fato das células de esperma serem frágeis e poderem ser danificadas pela centrifugação em uma velocidade excessiva; o tamanho do tubo de centrifugação irá afetar o tempo exigido para que as células de esperma se movam para o fundo do tubo; e as células de esperma serão mais provavelmente danificadas pela centrifugação em uma determinada velocidade o quanto mais continuar a centrifugação. Desse modo, em uma concretização da presente invenção, o tubo de centrifugação é centrifugado em 550-800g por um período de cerca de 6 - 10 minutos. De acordo com outra concretização da presente invenção, o tubo de centrifugação é centrifugado em 650-750g por um período de cerca de 6 - 10 minutos. Em ainda outra concretização, o tubo de centrifugação é centrifugado em 700g por um período de cerca de 6 - 10 minutos. Em ainda outra concretização, o tubo de centrifugação é centrifugado em 700g por um período de cerca de 6 - 10 minutos. Em ainda outra concretização, o tubo de centrifugação é configurado em 700 g por um período de cerca de 7 minutos.

[00401] Conforme demonstrado nos seguintes experimentos, a velocidade da centrífuga e a duração de centrifugação podem afetar a porcentagem de células de esperma recuperadas e a motilidade das

células de esperma recuperada. Os experimentos foram conduzidos sem separar, na verdade, as células de esperma. Em vez disso, vários fluidos incluindo amortecedores, extensores, fluidos de revestimento e um fluido de tingimento foram acrescentados às amostras de sêmen para simular o processo de separação. As amostras foram então centrifugadas em uma tentativa de concentrar as células de esperma.

Exemplo de centrifugação I

[00402] No exemplo de centrifugação I, sêmen bovino foi coletado e avaliado conforme descrito acima. A amostra de sêmen foi diluída com uma quantidade de tris - ácido cítrico ("TCA") apresentando um pH de 7,3 para se obter uma concentração de 150×10^6 de células de esperma/ml. Os espermatozóides foram tingidos com corante Hoechst 33342 (100 μ M) em 41°C por vinte minutos. Dois tubos de 15 ml foram preparados com tampões para a simulação. O tubo 1 foi parcialmente enchido com 750 μ l de solução salina tamponada de fosfato ("PSB") com 10% de gema de ovo e 14,25 ml de PSB com 0,1% de albumina de soro bovino ("BSA"). O tubo 2 foi parcialmente enchido com 750 μ l de TCA com 10% de gema de ovo e 14,25 ml de PSB com 0,1% de BSA. Cada um dos dois tubos recebeu 10 μ l da solução contendo os espermatozóides tingidos, que foram então incubados em temperatura ambiente por 20 minutos. Os dois tubos foram então divididos em duas frações de 7 ml cada. Uma fração para cada tubo foi centrifugada em 2250 rpm (cerca de 540g) por 7 minutos em uma centrífuga de tina fixa. A outra fração para cada dos dois tubos foi centrifugada em 2500 rpm (cerca de 660 g) por 7 minutos. Imediatamente após a centrifugação, pipetas de 10 ml foram usadas para removerem e salvaram o sobrenadante de cada fração. Os péletes foram novamente suspensos em 200 μ l de TCA com 10% de gema de ovo (pH 7,0). A motilidade de esperma de pré- e pós-centrifugação foi observada de acordo com um microscópio de contraste de fase. Cinquenta μ l de um fixador (0,1% de

glutaraldeído em 3,4% de citrato de Na) foram acrescentados a cada pélete e sobrenadante para imobilizar o esperma para a determinação de concentração com um hemacitômetro. Os números totais de espermatozóides foram calculados com base no volume usado/recuperado multiplicado pela concentração de esperma correspondente, conforme determinado pelo hemacitômetro. A taxa de recuperação foi calculada como o número total de espermatozóides no pélete dividido pela soma do número total de esperma no pélete e o número total de espermatozóides no sobrenadante.

[00403] Os resultados, conforme mostrado nas figuras 88 e 89, mostram que há pouca diferença na motilidade de célula de esperma causada pela variação da velocidade de centrifugação. Os resultados também mostram que a motilidade foi ligeiramente melhor com o uso de TCA comparado a PBS.

Exemplo de centrifugação II

[00404] No exemplo de centrifugação II, amostras de sêmen de três touros foram coletadas e avaliadas, conforme descrito acima. Uma das amostras foi desqualificada quanto à falha em atender os padrões de controle de qualidade iniciais. As outras duas amostras de sêmen foram diluídas com uma quantidade de TCA apresentando um pH de 7,3 a fim de se obter uma concentração de esperma de 150×10^6 espermatozóides/ml. Os espermatozóides foram tingidos com $10 \mu\text{M}$ de uma solução de corante Hoechst 33342 em 41°C por vinte minutos. Um tampão simulado contendo $1500 \mu\text{l}$ de PBS com 10% de gema de ovo e $28,3 \text{ ml}$ de PBS com 0,1% de BSA foi acrescentado a cada um dos dois tubos. Duzentos μl de espermatozóides tingidos (30×10^6 de células de esperma) foram acrescentados a cada tubo e incubados em temperatura ambiente por vinte minutos. Três frações de 9 ml de mistura de sêmen foram tiradas de cada dos dois tubos para centrifugação. Uma fração de cada das duas amostras foi centrifugada por sete minutos

em um tubo de centrifugação de 15 ml em cada das seguintes velocidades: 550g; 650g; e 750g. A temperatura durante a centrifugação era de 22°C. Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi removido com uma pipeta de 10 ml, deixando cerca de 200-300 µl de sobrenadante no pélete. Os péletes foram novamente suspensos com 200 µl de TCA apresentando 10% (v/v) de gema de ovo apresentando um pH de 7,0. A motilidade do espermatozoide da pré- e pós-separação foi observada de acordo com um microscópio de contraste de fase. Uma séria aglutinação de espermatozoide foi notada nas amostras de pós-centrifugação de um dos dois touros. Cinquenta µl de uma mistura (0,1% de glutaraldeído em 3,4% de citrato de Na) foram acrescentados a cada sobrenadante e pélete para imobilizar o espermatozoide para a determinação de concentração. A taxa de recuperação foi determinada de acordo com a fórmula explicada no experimento de centrifugação I.

[00405] Os resultados são mostrados na figura 90. Os resultados mostram a taxa de recuperação aperfeiçoada de células de espermatozoide em 650g comparados aos 550g. Entretanto, há pouca diferença na taxa de recuperação entre 650g e 750g. Há pouca diferença significativa na motilidade de célula de espermatozoide causada pela variação da velocidade da centrífuga.

Exemplo de Centrifugação III

[00406] Para exemplo de centrifugação III, o procedimento do exemplo de centrifugação foi substancialmente repetido com os mesmos três touros em uma dia diferente. Os resultados são mostrados na figura 91. Os resultados confirmam que há pouca diferença na taxa de recuperação em 650g comparados aos 750g.

Exemplo de Centrifugação IV

[00407] Foi coletado sêmen de dois touros diferentes em dois dias diferentes. O sêmen foi transportado e avaliado da maneira descrita acima. Com base na concentração de espermatozoide de sêmen em estado

natural, os espermatozóides foram diluídos com tris - ácido cítrico (CA, pH 7,3) mais 10mM de piruvato, em uma concentração de 150×10^6 espermatozóides/ml. Os espermatozóides foram tingidos com $10 \mu\text{M}$ de corante Hoechst 33342 em 41°C por 20 minutos. Depois do tingimento, $267 \mu\text{l}$ da solução contendo os espermatozóides foram diluídos em uma concentração de 1×10^6 espermatozóides/ml além dos seguintes tampões simulados: 2 ml de PBS com 10% (v/v) de gema de ovo; e 37,733 ml de PBS com 0,1% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA). Os espermatozóides tingidos e tampões simulados foram incubados em temperatura ambiente por pelo menos 20 minutos. Quatro frações de 9 ml foram tomadas da mistura de espermatozóides tingidos e tampão simulado obtida de cada touro. As quatro frações do primeiro touro foram centrifugadas em combinações variadas de velocidade e duração de centrifugação na seguinte seqüência:

- (1) 700g por 7 minutos para a primeira fração;
- (2) 700g por 10 minutos para a segunda fração;
- (3) 650g por 10 minutos para a terceira fração; e
- (4) 650g por 7 minutos para a quarta fração.

[00408] As quatro frações do segundo touro foram centrifugadas em combinações variadas de velocidade e duração da centrifugação na seguinte seqüência:

- (1) 700g por 10 minutos para a primeira fração;
- (2) 700g por 7 minutos para a segunda fração;
- (3) 650g por 10 minutos para a terceira fração; e
- (4) 650g por 7 minutos para a quarta fração.

[00409] Toda a centrifugação foi executada em tubos de centrifugação de 15 ml em uma centrífuga de cabeça oscilante (Allegra 6R, Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA) em 22°C . O intervalo de tempo entre a coleta de sêmen na fazenda e a centrifugação em laboratório foi de 4-5 horas. Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante

foi removido com pipetas de 10 ml, deixando ~250 µl de supernadantes com cada pélete. Os péletes foram novamente suspensos em 250 µl de PBS de Dulbecco (pH 7,0). A motilidade e a motilidade progressiva do espermatozóide foram observadas com o uso de um Analisador de Motilidade Halmiton-Thorn (duas lâminas por amostra; duas câmaras por amostra) depois do tingimento, mas antes da centrifugação e novamente depois da centrifugação. A concentração de espermatozóides foi determinada pela medição de hemacitômetro de uma fração de 100 µl de espermatozóides tingidos de pré-centrifugação e mistura tampão simulada que foi colocada no congelador e uma fração de 10 µl de péletes novamente suspensos misturada com 90 µl de fixador (0,1% de glutaraldeído em 3,4% de citrato de Na). A taxa de recuperação foi determinada como no Exemplo de Centrifugação I. Os resultados são mostrados nas figuras 92 e 93.

[00410] Os dados indicam que > 85% dos espermatozóides podem ser recuperados depois da centrifugação em 650g ou 700g, por 7 ou 10 minutos (figura 92). Entretanto, a taxa de recuperação foi ligeiramente melhor (95%) em 700g. O declínio na motilidade depois da centrifugação (comparada à centrifugação anterior) em todos os tratamentos poderia ser devido à presença de espermatozóides mortos/anormais/frágeis que não poderiam suportar a tensão da força centrífuga. A motilidade do espermatozóide declinou em 10-14% (figura 93) em todos os tratamentos. O declínio mais alto na motilidade do espermatozóide (14%) em 650g por 7 min poderia se dar devido à exposição mais prolongada do espermatozóide ao tampão simulado à medida que a centrifugação em 650g foi conduzida depois de 700. A centrifugação não mostrou qualquer efeito adverso na motilidade progressiva de espermatozóides, tendo havido, um aperfeiçoamento de 2-3%.

Exemplo de Centrifugação V

[00411] Foi coletado sêmen de um touro em dois dias diferentes. O

sêmen foi avaliado, diluído e tingido com corante Hoechst 33342, e adicionalmente diluído em tampões simulados, conforme descrito no Exemplo de Centrifugação IV. Quatro frações de 9 ml dos espermatozóides tingidos e mistura tampão simulada foram obtidas para cada das duas amostras de sêmen. As frações da primeira amostra foram centrifugadas em uma das seguintes combinações de velocidade e duração de centrifugação na seguinte seqüência:

- (1) 750g por 10 minutos para a primeira fração;
- (2) 750g por 7 minutos para a segunda fração;
- (3) 700g por 10 minutos para a terceira fração; e
- (4) 700g por 7 minutos para a quarta fração.

[00412] Para as frações obtidas a partir da segunda amostra, as combinações de velocidade e duração de centrifugação foram as mesmas, mas a seqüência foi modificada, como segue:

- (1) 750g por 7 minutos para a primeira fração;
- (2) 750g por 10 minutos para a segunda fração;
- (3) 700g por 7 minutos para a terceira fração; e
- (4) 700g por 10 minutos para a quarta alíquota.

[00413] A centrifugação foi conduzida em um tubo de centrifugação de 15 ml em uma centrífuga de cabeça oscilante (Allegra 6R, Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA) em 22°C. O intervalo entre a coleta de sêmen na fazenda e a centrifugação em laboratório foi de cerca de 6,5 horas para a primeira amostra e cerca de 4 horas para a segunda amostra. O processamento de pós-centrifugação, isto é, a remoção de sobrenadante, a ressuspensão de pélete, a determinação de concentração de espermatozóides, e a estimativa de motilidade via o Analisador de Motilidade Hamilton-Thorn, foi conduzido seguindo o mesmo procedimento, conforme descrito no Exemplo IV. Os resultados são mostrados nas figuras 94 e 95.

[00414] Os resultados mostram que > 85% da população de esper-

mas em suspensão altamente diluída podem ser recuperados com 700g ou 750g em 7 minutos ou 10 minutos (figura 94). Um aumento na força g para 750g não aperfeiçoou a taxa de recuperação de modo significativo. Como foi o caso no Exemplo de Centrifugação IV, o declínio na motilidade depois da centrifugação (conforme comparado antes da centrifugação) foi observado em todos os tratamentos. No presente experimento, a motilidade de espermatozoides declinou em 13-20% (figura 95) que é um pouco mais alta do que no Exemplo de Centrifugação IV. A variação poderia se dar devido à variação na amostra de sêmen e a um intervalo de tempo mais longo a partir da coleta de sêmen para a centrifugação (6 horas) em uma repetição. Conforme explicado no Exemplo IV, o declínio na motilidade dos espermatozoides (cerca de 20%) em centrifugação de baixa velocidade (700xg, por 7 ou 10 min) poderia se dar devido a uma maior exposição dos espermatozoides ao tampão simulado à medida que eles foram centrifugados depois de 750g de centrifugação. O declínio na motilidade progressiva foi insignificante (1-5%).

B. Centrifugação Secundária

[00415] A fim de recuperar o espermatozoide que poderia de outra forma ser perdido no sobrenadante, é possível centrifugar o sobrenadante depois que ele foi separado do pélete. Sem qualquer ligação a uma teoria específica, os requerentes acreditam que a interfase de pélete/sobrenadante impede o movimento de espermatozoides para o pélete. A remoção da interfase por meio da separação do pélete do sobrenadante irá permitir que a centrifugação adicional do sobrenadante faça com que as células de espermatozoide permaneçam no sobrenadante para formar um segundo pélete. O segundo pélete pode ser novamente suspenso e acrescentado ao espermatozoide novamente suspenso a partir do primeiro pélete.

C. Filtração

[00416] Um método de concentração alternativo que pode ser usado para impedir a perda de células de esperma no sobrenadante é a filtração. Conforme mostrado na figura 96, de acordo com uma concretização exemplificativa, um filtro 2415 é incorporado em um vaso de coleta 2403. O tamanho dos poros no filtro são desejavelmente na faixa de cerca de 0,2 - 1 micrão. Também é desejável que o filtro não seja um filtro profundo (por exemplo, um filtro apresentando passagens tortuosas nas quais as caudas do esperma possam ser capturadas). Certamente, é desejável que o filtro seja tão fino quanto possível. Por exemplo, é desejável que a espessura do filtro esteja na faixa de 50µm a 500µm; mais desejável, que a espessura do filtro esteja na faixa de 75µm a 250µm; e mais desejável que a espessura do filtro esteja na faixa de 100µm a 150µm. Um vácuo de nível baixo 2417 é aplicado para remover os fluidos através do filtro à medida que as gotículas 33 são coletadas. É importante usar um vácuo de nível inferior (menos de 508 mm (20 polegadas) de mercúrio, por exemplo, 381 mm (15 polegadas) de mercúrio)) para impedir danos às células de esperma. Em uma concretização, o vácuo é baixo o suficiente para que a taxa de remoção de fluido seja de cerca de 1,0 ml/15 segundos. De acordo com outra concretização da presente invenção, o vácuo é aplicado intermitentemente para permitir que as células de esperma tenham uma chance de se recuperarem. Em ainda outra concretização, o filtro 2415 é construído de um material que é compatível com as células de esperma, embora não tenha qualquer afinidade para elas. Na conclusão da separação, cerca de 80-90% dos fluidos terão sido removidos através do filtro. Entretanto, permanece fluido suficiente (cerca de 10-20%) no qual as células de esperma estão em uma pasta fluida concentrada 2405, impedindo assim que as células de esperma formem uma torta de filtro. A suspensão concentrada pode ser transferida para outro recipiente 2419, conforme mostrado na figura 97, por exemplo. Um me-

canismo de seringa 2409 com um filtro de ponta de cânula 2411 pode ser usado para remover parte do fluido restante deste recipiente 2419. Entretanto, fluidos suficientes são deixados no recipiente para impedir que as células de esperma se solidifiquem no filtro 2411. As mesmas considerações se aplicam ao filtro de ponta de cânula 2411 como o filtro 2415 no vaso de coleta. Desse modo, o tamanho de poro do filtro de cânula 2411 está desejavelmente na faixa de cerca de 0,2 - 1,0 microm e o filtro de cânula é relativamente fino para impedir que as caudas de esperma sejam aprisionadas em passagens tortuosas no filtro. Por exemplo, um filtro de ponta de seringa de fibra de polipropileno oca DynaGard®, que se encontra comercialmente disponível pela Spectrum Laboratories, Inc. de Rancho Dominguez, CA, pode ser usado para o filtro de ponta de cânula. Conforme mostrado na figura 98, um fluido de ressuspensão 2413 é esguichado através do filtro de ponta de cânula para lavar as células que podem estar presas à superfície do filtro novamente para a pasta fluida. O fluido de ressuspensão pode incluir uma quantidade do fluido filtrado e/ou um extensor adequado. Depois que uma quantidade de fluido de ressuspensão suficiente para remover as células de esperma do filtro foi esguichada novamente através do filtro, pode ser acrescentado fluido de ressuspensão adicional, caso desejado. A quantidade total de fluido de ressuspensão é selecionada para trazer a concentração para uma concentração desejada (por exemplo, cerca de 20×10^6 de células de esperma/ml). Dessa forma, o processo de filtração desta concretização é um processo de três etapas envolvendo o uso de um filtro no vaso de coleta, a filtração usando um filtro de cânula, e a ressuspensão para se obter a concentração desejada.

[00417] Em um processo de filtração alternativo de duas etapas, as primeira e segunda etapas do processo de três etapas descrito acima são combinadas de modo que a remoção de todo o fluido aconteça

através de um filtro de cânula. Neste processo, as células de esperma separadas são direcionadas para um vaso de coleta que não apresenta um filtro. Os fluidos são removidos por vácuo inferior e/ou vácuo intermitente, conforme descrito acima, que é aplicado através do filtro de ponta de cânula 2411. Quando as células de esperma estiverem em uma pasta fluida concentrada, um fluido de ressuspensão, tal como, por exemplo, um extensor, será descarregado novamente através do filtro de cânula para se obter a concentração desejada de células de esperma.

Exemplo de Filtração I

[00418] O exemplo de filtração I mostra a taxa de recuperação e a motilidade das células de esperma depois da concentração por um processo de filtração de três etapas da presente invenção. As amostras de sêmen foram coletadas de três touros e avaliadas à medida que providas na seção de preparação de amostra acima. Uma das três amostras de sêmen foi desqualificada por deixar de atender aos critérios de qualidade iniciais mínimos. Duas amostras restantes foram diluídas com uma quantidade de TCA (pH 7,3) necessária para se conseguir uma concentração de 150×10^6 células de esperma/mil. Quinhentos ul de PBS com 10% de gema de ovo e 9,5 ml de PBS com 0,1% de BSA foram acrescentados a cada dos dois tubos de teste de 15 ml. Sessenta e sete ul de amostra de sêmen (cerca de 10×10^6 células de esperma) foram acrescentados a cada tubo de teste e incubados por vinte minutos em temperatura ambiente. Com referência à figura 99, uma bomba de vácuo 2427 foi usada para aplicar pressão negativa para extrair uma fração de quatro ml do sêmen diluído 2423 através do filtro 2425. O filtrado 2429 foi coletado em uma seringa 2421. Depois da filtração, as células de esperma no filtro foram descarregadas novamente com 1 ml de tampão TCA em um tubo de 15 ml. A motilidade do esperma foi visualmente avaliada. As amostras de

pré- e pós-filtração foram misturadas com um fixador (0,1% glutardeído em 3,4 de citrato de Na) para imobilizar as células de esperma. A concentração de esperma foi determinada com o uso de um hemacitômetro. O número total de células de esperma foi calculado com base no volume multiplicado pela concentração de células de esperma. A taxa de recuperação foi calculada como o número total de células de esperma na porção descarregada dividida pelo número total de células de esperma na fração antes da filtração. O processo foi repetido com um filtro diferente. O experimento testou ambos os seguintes filtros: (1) um filtro de disco (seringa) de membrana de PTFE (não FTPE) de 1,0 μm (que se encontra disponível pela Pall Corporation, Life Science Group, Ann Arbor, MI, Cat nº PN4226T ou VWR, Batavia IL, Cat nº28143-928); e (2) filtro de disco (membrana) de 0,8 SFCA (acetato de celulose isento de tensoativo) (Corning, Inc., Corning, NY, Cat. nº431221; VWR Batavia, IL, Cat. nº28200-028). Os resultados são mostrados na figura 101. Mais espermatozóides foram recuperados com filtros de acetato de celulose conforme comparados com o filtro PTFE, isto é, 67 versus 33% devido à baixa afinidade de ligação de proteína de acetato de celulose. A motilidade visual dos espermatozóides recuperou na faixa de 65% (PTFE) a 68% (acetato de celulose).

Exemplo de Filtração II

[00419] O exemplo de filtração II mostra a taxa de recuperação e a motilidade das células de esperma depois da concentração pelo processo de filtração de duas etapas da presente invenção. As amostras de sêmen foram coletadas de três touros e avaliadas à medida que providas na seção de preparação de amostra acima. As três amostras foram diluídas com uma quantidade de TCA (pH 7,3) necessária para se obter uma concentração de 150×10^6 de células de esperma/ml. Um ml e meio de PBS com 10% de gema de ovo e 28,3 ml de PBS com 0,1% de BSA foram acrescentados a cada dos 50 tubos de teste

e incubados por vinte minutos em temperatura ambiente. Com referência à figura 100, uma seringa 2431 foi usada para aplicar pressão necessária para extrair uma fração de 6 ml do sêmen diluído 2433 de cada tubo de teste através de um filtro 2435. O filtro foi colocado em um suporte de filtro 237 (um suporte de filtro Swinnex da Millipore Corporation, Billerica, MA Cat nº SX0002500). Depois da filtração, o suporte de filtração 2437 foi desconectado da seringa e da tubulação, mantendo o suporte de filtro intacto. Os espermatozóides no filtro foram coletados com a rotação da montagem de filtro de cabeça para baixo e a descarga com 1 ml de tampão de TCA usando uma seringa de 3 ml apresentando uma peça pequena de tubulação na ponta em um tubo de teste de 15 ml. A motilidade do esperma foi avaliada visualmente. As amostras de pré- e pós-filtração foram misturadas com um fixador (0,1% de glutardeído em 3,4 de citrato de Na) para imobilizar as células de esperma. A concentração de esperma foi determinada com o uso de um hemacitômetro. O número total de células de esperma e a taxa de recuperação foram calculados conforme especificado no exemplo de filtração 1. O processo foi repetido duas vezes para testar diferentes filtros. O experimento testou ambos os seguintes filtros: (1) um filtro de membrana de Teflon de 0,2 μm (que se encontra disponível pela X-Partek, P. J. Cobert Associates Inc. St. Louis Cat. nº 944106); e (2) um filtro de membrana de 0,8 acetato de celulose (Millipore Corporation, Billerica, MA Cat. nº AAWP 02500). Os resultados foram mostrados na figura 102. Em ambos os filtros, a taxa de recuperação dos espermatozóides foi baixa (~25%). Foi baixa no filtro de Teflon, como no exemplo 1. Entretanto, a baixa taxa de recuperação e a motilidade visual dos espermatozóides descarregados no filtro de acetato de celulose poderiam ser devido ao material usado por diferentes fornecedores e/ou a capacidade dos espermatozóides de se conectarem com o suporte de filtro/montagem.

D. Concentração de Meio Denso

[00420] Outro processo alternativo de concentração do esperma coletado conta com a flutuação de células de esperma em um meio de alta densidade. De acordo com este processo, um meio de alta densidade é acrescentado às células de esperma coletadas para elevar a gravidade específica da suspensão acima de cerca de 1,3. Por exemplo, uma suspensão de sílica coloidal, tal como é disponível de acordo com os nomes comerciais Percoll® e Isolate®, pode ser usada para aumentar a gravidade específica da suspensão. As células de esperma irão flutuar no topo da suspensão, onde elas poderão ser escumadas ou de outro modo coletadas, por causa da gravidade específica aumentada da suspensão. Um fluido de ressuspensão é acrescentado às células de esperma que foram coletadas da superfície para trazer a concentração final para cerca de 20×10^6 células de esperma/ml. Parte do fluido de suspensão pode ser removida por um dos processos de filtração descritos acima antes da adição do meio de alta densidade para reduzir a quantidade de meio de densidade elevada exigido para se obter a gravidade específica desejada.

CRIOEXTENSÃO**A. Crioproteção**

[00421] Uma vez que os espermatozoides tenham sido separados e coletados nos vasos de coleta, eles podem ser usados para inseminação de mamíferos fêmeas. Isto pode ocorrer imediatamente, exigindo pouco tratamento adicional do esperma. Do mesmo modo, o esperma pode ser também resfriado ou congelado para uso em uma data posterior. Em tais exemplos, o esperma pode se beneficiar do tratamento adicional para minimizar o impacto sobre a viabilidade ou motilidade pós-descongelamento como resultado do resfriamento e congelamento.

[00422] De modo geral, um crioextensor compreende um tampão

ou solução tampão, uma fonte de proteína, e um crioprotetor. Exemplos de tampões e soluções tampão que podem ser usados no crioextensor são discutidos acima com relação à coleta e extensão de amostra. Tipicamente, estes tampões estarão em uma concentração de cerca de 0,001M a cerca de 1,0M e ter um pH de cerca de 4,5 a cerca de 8,5 preferivelmente de cerca de 7,0.

[00423] Caso incluída, uma fonte de proteína poderá ser acrescentada para prover suporte para as células de esperma e para amortecer o contato das células com o vaso de coleta. A fonte de proteína pode ser qualquer fonte de proteína que não interfira com a viabilidade das células de esperma e que seja compatível com o tampão ou solução tampão específica que é usada. Exemplos de fontes de proteína comuns incluem o leite (incluindo leite homogeneizado por calor e leite desnatado), extrato de leite, gema de ovo, extrato de gema de ovo, proteína de soja e extrato de proteína de soja. Tais proteínas podem ser encontradas em uma concentração de cerca de 10% (v/v) a cerca de 30% (v/v), preferivelmente de cerca de 10% (v/v) a cerca de 20% (v/v), e mais preferivelmente de cerca de 20% (v/v). Enquanto o leite pode ser usado em combinação com um tampão ou solução tampão, geralmente, o leite é usado na ausência dos mesmos, visto que o leite é uma solução em si que pode atender ao mesmo propósito de um tampão ou solução tampão. Em tais exemplos, o crioextensor conterá cerca de 80% (v/v) a cerca de 90% (v/v) de leite.

[00424] Um crioprotetor é preferivelmente incluído no crioextensor para diminuir ou impedir o choque frio ou para manter a fertilidade do esperma. Inúmeros crioprotetores são conhecidos na técnica. A seleção de um crioprotetor adequado para uso com um determinado extensor pode variar, e depende das espécies das quais foi obtido o esperma a ser congelado. Exemplos de crioprotetores adequados incluem, por exemplo, glicerol, sulfóxido de dimetila, etilenoglicol, propile-

noglicol, trealose, Triladyl®, e combinações dos mesmos. Caso incluídos, geralmente, estes crioprotetores estão presentes no crioextensor em uma quantidade de cerca de 1% (v/v) a cerca de 15% (v/v), preferivelmente em uma quantidade de cerca de 5% (v/v) a cerca de 10% (v/v), mais preferivelmente em uma quantidade de cerca de 7% (v/v), e mais preferivelmente em uma quantidade de cerca de 6% (v/v).

[00425] Em uma concretização específica, o crioextensor compreende água, Triladyl®, gema de ovo, e ácido pirúvico. Em ainda outra concretização, o crioextensor compreende 25g de Triladyl®, 25 g de gema de ovo, e 10mM de ácido pirúvico em 75mL de água.

[00426] Opcionalmente, o crioextensor pode também conter uma faixa de aditivos que são benéficos para a viabilidade ou motilidade do esperma e que impedem ou diminuem os efeitos laterais prejudiciais da criopreservação. Tais aditivos podem incluir, por exemplo, uma fonte de energia, um antibiótico, ou uma composição que regula as reações de oxidação/redução intracelularmente e/ou externamente, cada uma das quais sendo discutida acima com relação à coleta e diluição de amostra. Os ditos aditivos podem ser acrescentados ao crioextensor de acordo com os mesmos.

B. Criopreservação de Células de Esperma Separadas

[00427] Na maioria dos casos, não será possível usar as células de esperma que foram separadas, conforme descrito acima, para a inseminação artificial imediata. Particularmente, no caso de uma operação comercial de separação de esperma, as células de esperma separadas têm que ser armazenadas e/ou transportadas antes que elas possam ser usadas para a inseminação artificial. Isto irá geralmente exigir a criopreservação das células de esperma. O esperma separado pode ser localizado em cilindros alongados (conhecidos como "canudos" na indústria de criação) e criopreservado para preservar o esperma durante o transporte e o armazenamento. As células de esperma criopre-

servado podem ser armazenadas por longos períodos de tempo em nitrogênio líquido. Para se usar o esperma criopreservado, o canudo pode ser imerso em um banho de água aquecida para descongelar o esperma. Depois, o canudo é carregado em uma pistola de inseminação artificial que é usada para inseminar um animal fêmeo. Diversas precauções têm que ser tomadas para proteger as células de esperma durante a criopreservação. De outro modo, as células de esperma ficarão tão danificadas (conforme indicado por uma baixa taxa de motilidade de pós-descongelamento de 5-10%) que elas não se encontrarão adequadas para uso em inseminação artificial.

[00428] Métodos de criopreservação convencionais envolvem o acréscimo seqüencial de uma fonte de proteína (por exemplo, gema de ovo), o resfriamento do esperma a uma temperatura de cerca de 4 - 5°C, o acréscimo de um crioprotetor (por exemplo, glicerol), a manutenção do esperma e do crioprotetor em uma temperatura estável na faixa de cerca de 4 -5°C por um período de tempo suficiente para permitir que as células de esperma sejam equilibradas com o crioprotetor, e o posterior super-resfriamento do esperma, como por meio da imersão das células de esperma em nitrogênio líquido em -196°C para armazenamento. Aqueles versados na técnica irão reconhecer que a finalidade da fonte de proteína é a de proteger os espermatozoides contra danos, à medida que eles são resfriados de cerca de 14°C a cerca de 8°C, que é a temperatura na qual as células de esperma são mais suscetíveis ao choque frio. Em contraste, o crioprotetor protege as células de esperma contra danos em temperaturas abaixo de 0°C. Mesmo que as temperaturas envolvidas na criopreservação estejam bem abaixo do congelamento, com o termo "congelamento" que, às vezes, é usado para descrever a criopreservação, aqueles versados na técnica irão também saber que os espermatozoides criopreservados não estão, na verdade, congelados. Precisamente, os espermatozoides criopreservados es-

tão em um estado super-resfriado. O período convencional durante o qual as células de esperma e o crioprotetor são mantidos em uma temperatura estável pode durar de 60 minutos a várias horas. O tempo total para completar a criopreservação usando os métodos convencionais geralmente excede quatro horas. Adicionalmente, acredita-se que até 50% das células de esperma sejam mortos em processos de criopreservação convencionais. Embora os espermatozoides sejam criopreservados com o uso de métodos convencionais, de acordo com algumas concretizações da presente invenção, outras concretizações da presente invenção empregarão métodos de criopreservação aperfeiçoados para reduzir o tempo exigido para a criopreservação e/ou para aperfeiçoar a saúde do esperma criopreservado.

[00429] A figura 103 mostra um diagrama de fluxo de trabalho que resume as etapas de uma concretização exemplificativa de um método aperfeiçoado de criopreservação de esperma, de acordo com a presente invenção. Na etapa 2501, a concentração de uma solução contendo células de esperma separadas é ajustada para ficar na faixa de cerca de 1 milhão - 40 milhões de espermatozoides/ml, dependendo do padrão usado pelo consumidor alvo (por exemplo, a associação de criação). Por exemplo, a concentração de espermatozoides pode ser ajustada como estando na faixa de cerca de 20 milhões a 24 milhões de espermatozoides/ml. O ajuste da concentração de espermatozoides pode incluir a adição de fluido de ressuspensão, tampões e/ou extensores ao esperma concentrado, conforme descrito acima. Na etapa 2503, um crioprotetor (por exemplo, glicerol) é acrescentado antes que os espermatozoides sejam resfriados. As células de esperma começam a se equilibrar com o crioprotetor tão logo elas entrem em contato com o crioprotetor. Na etapa 2505, uma fonte de proteína (por exemplo, gema de ovo) é também acrescentada à solução contendo as células de esperma, conforme descrito acima.

[00430] A solução de célula de esperma, a fonte de proteína, e o

crioprotetor são carregados em canudos de inseminação artificial convencionais de 0,5 ou 0,25 ml com o uso de uma máquina de carregamento convencional, na etapa 2507. Aqueles versados na técnica ficarão familiarizados com inúmeros aparelhos e técnicas convencionais que podem ser usados para o carregamento de sêmen em canudos. Por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.249.610, para Cassou e outros, emitida em 5 de outubro de 1993, e incorporada aqui para referência, dá instruções a cerca do enchimento de canudos com sêmen bovino usando um bocal de injetor descartável. Além disso, o equipamento para encher canudos se encontra comercialmente disponível pela Minutube of America, localizada em Verona WI. Qualquer destes métodos e aparelhos de carregamento convencionais ou similares podem ser usados para carregar células de espermatozoides separadas em canudos.

[00431] Depois do carregamento, as células de espermatozoides são resfriadas a uma temperatura, na etapa 2509. Em geral, a temperatura de manutenção deve ser selecionada com as seguintes considerações em mente: a conservação das células de espermatozoides em uma temperatura que é alta demais (por exemplo, 10°C) pode ocasionar danos desnecessários originários do choque frio; acredita-se que o equilíbrio das células de espermatozoides com um crioprotetor (por exemplo, glicerol) seja mais ativo em temperaturas na faixa de 4-5°C; e acredita-se que a conservação das células de espermatozoides em temperaturas que são baixas demais (por exemplo, < 0°) seja prejudicial às células de espermatozoides. Desse modo, de acordo com uma concretização, a temperatura de conservação está na faixa de 0-8°C. Mais desejavelmente, a temperatura de conservação está na faixa de 2-6°C. Ainda mais desejavelmente, a temperatura de conservação está na faixa de 4-5°C. Em outra concretização, a taxa de resfriamento usada para esta etapa 2509 é selecionada para minimizar os danos às células de espermatozoides. Por exemplo, a taxa de resfriamento pode ser controlada (por exemplo,

substancialmente constante) para prover resfriamento homogêneo e para impedir que os espermatozoides sofram um choque de temperatura. A taxa de resfriamento deve também resfriar os espermatozoides rapidamente o suficiente para reduzir seu metabolismo antes que eles atraiam sobre si danos de membrana, mas lentamente o suficiente para que eles não sofram um choque de temperatura. Pode-se controlar a taxa de resfriamento com a colocação dos canudos contendo as células de espermatozoides em um congelador programável (por exemplo, um congelador Ice-Cube 1810CD, que se encontra comercialmente disponível pela Minutube of America, localizada em Verona WI) para resfriá-los. De acordo com uma concretização, o congelador programável resfria os espermatozoides aproximadamente da temperatura ambiente (tipicamente na faixa de cerca de 22 e 24°C) em uma taxa de resfriamento constante de 0,1 e 0,3°C/minuto. Mais desejavelmente, a taxa de resfriamento está na faixa de cerca de 0,15 a 0,25°C/minuto. Ainda mais desejavelmente, a taxa de resfriamento é de cerca de 0,2°C/minuto. Em outra concretização, a taxa de resfriamento é selecionada de modo que os espermatozoides sejam resfriados de sua temperatura inicial para a temperatura de conservação em cerca de 90 minutos. Em ainda outra concretização, a taxa de resfriamento é selecionada para resfriar os espermatozoides de sua temperatura inicial para a temperatura de conservação em uma taxa de resfriamento constante em cerca de 90 minutos. As taxas de resfriamento indicadas acima se referem, na verdade, à taxa de resfriamento da câmara do congelador programável, mas devido às paredes finas e espaço longo e fino do canudo (por exemplo, cerca de 133,35 mm (5,25 polegadas) de comprimento, menos de 3 mm de diâmetro, e cerca de 0,15 mm de espessura de parede) e às propriedades condutivas do canudo, a diferença de temperatura entre as células de espermatozoides e a câmara de resfriamento não é significativa.

[00432] Depois que as células de espermatozoides tenham sido resfriadas à

temperatura de conservação, na etapa 2511, elas são mantidas nessa temperatura ou próximo dessa temperatura por um período para permitir a conclusão substancial de seu equilíbrio com o crioprotetor. Por exemplo, o congelador programável descrito acima pode ser programado para conservar as células de esperma em uma temperatura estável durante o período. De acordo com outra concretização da presente invenção, as células de esperma são mantidas na temperatura de conservação por um período que é curto comparado aos métodos convencionais, porque os espermatozoides já foram equilibrados com o crioprotetor durante o processo de resfriamento. Por exemplo, o período pode estar na faixa de cerca de 10 e 60 minutos. Mais desejavelmente, o período está na faixa de cerca de 20 a 40 minutos. Ainda mais desejavelmente, o período é de cerca de 30 minutos. Em outra concretização, o período é menor que 60 minutos. Em ainda outra concretização, o período é menor que 40 minutos. O período de conservação relativamente curto oferece inúmeras vantagens em um processo comercial de separação de espermatozoides. Primeiro, ele reduz o tempo exigido para processar espermatozoides separados, o que pode se traduzir em economias de tempo. Também, as células de esperma ainda executam processos metabólicos nas temperaturas na faixa de 0-8°C, reduzindo assim o tempo para o qual os espermatozoides precisam ser mantidos nesta temperatura possa aperfeiçoar a saúde das células de esperma, o que irá aumentar o valor das células de esperma para os criadores de animais que estão preocupados com as taxas de sucesso de inseminação artificial.

[00433] Depois que as células de esperma foram mantidas na temperatura de conservação por um período descrito acima, as células de esperma são resfriadas, na etapa 2513, a uma temperatura que se aproxima da zona de temperatura crítica para a criopreservação de espermatozoides. Aqueles versados na técnica irão saber que a zona de tem-

peratura crítica é a zona na qual a formação de cristal de gelo e as mudanças na pressão osmótica danificam as células de esperma. Esta temperatura pode variar dependendo da solução na qual as células de esperma são criopreservadas, embora a zona de temperatura crítica esteja geralmente na faixa de -18 e -35°C. Às vezes, esta zona de temperatura crítica é relatada como estando na faixa de cerca de -18 a -30°C. Desse modo, de acordo com ainda outra concretização da presente invenção, a taxa de resfriamento usada para resfriar as células de esperma da temperatura de conservação para uma temperatura que se aproxima - 18°C (por exemplo, -15°C) é selecionada para proteger a saída dos espermatozoides. Fatores relevantes para serem levados em consideração incluem aquele fato em que as células de esperma ainda estão em equilíbrio com o crioprotetor durante este período, o fato de que os espermatozoides estão ainda executando algumas funções metabólicas, e o fato de que os espermatozoides ainda são, de alguma maneira, sensíveis à rápida mudança de temperatura. Novamente, é desejável que a taxa de resfriamento seja uma taxa controlada, tal como a taxa que pode ser programada no congelador programável descrito acima. Mais desejavelmente, a taxa de resfriamento usada para resfriar o esperma da temperatura de conservação para uma temperatura que se aproxima de cerca de -18°C é uma taxa de resfriamento constante. Desse modo, de acordo com outra concretização da presente invenção, as células de esperma são resfriadas a partir da temperatura de conservação a cerca de -15°C em uma taxa de resfriamento na faixa de cerca de 1,0 - 5,0°C/minuto. Mais desejavelmente, a taxa de resfriamento está na faixa de cerca de 2,0 - 4,0°C/minuto. Ainda mais desejavelmente, a taxa de resfriamento é de cerca de 3,0°C/minuto.

[00434] A etapa 2515 envolve o resfriamento rápido das células de esperma através da zona de temperatura crítica para limitar o tempo em que as células de esperma ficam paradas na mesma. Desse modo,

de acordo com uma concretização da presente invenção, a taxa de resfriamento através da zona de temperatura crítica aproximada (por exemplo, -18°C a cerca de -30°C) é selecionada para ser mais rápida do que a taxa de resfriamento usada para resfriar as células de espermatozoário para a temperatura de conservação e a taxa de resfriamento usada para resfriar as células de espermatozoário à temperatura que se aproxima da zona de temperatura crítica. Desse modo, a taxa de resfriamento mais acentuada está desejavelmente na faixa de cerca de $8 - 40^{\circ}\text{C}$ por minuto. Mais desejavelmente, a taxa de resfriamento mais acentuada está na faixa de cerca de $8 - 12^{\circ}\text{C}$ por minuto. Mais desejavelmente, a taxa de resfriamento mais acentuada é de cerca de 10°C por minuto. A faixa de temperatura sobre a qual a taxa de resfriamento mais acentuada é usada pode se prolongar além da zona de temperatura crítica. Desse modo, em ainda outra concretização da presente invenção, as células de espermatozoário são resfriadas em uma das taxas de resfriamento mais acentuada descritas acima de cerca de -15°C a cerca de -40°C . Em ainda outra concretização, as células de espermatozoário são resfriadas em uma das taxas de resfriamento mais acentuada descritas acima de cerca de -15°C a cerca de -80°C . A etapa de resfriamento de espermatozoários através da zona de temperatura crítica em uma taxa mais acentuada pode ser executada no congelador programável descrito acima.

[00435] Depois que as células de espermatozoário foram resfriadas abaixo da zona de temperatura crítica (por exemplo, a -80°C), os canudos contendo os espermatozoários separados são imersos em nitrogênio líquido (-198°C), na etapa 2517, para prover uma vida útil máxima das células de espermatozoário separadas. O uso de nitrogênio líquido para armazenar os espermatozoários criopreservados é muito difundido na indústria de criação animal do contexto de espermatozoários não-separados. Assim, aqueles versados na técnica ficarão familiarizados com as tecnologias que envol-

vem o transporte e o armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido, o que não precisa ser discutido em maiores detalhes aqui. É suficiente notar que recipientes convencionais se encontram disponíveis para proverem um armazenamento de longo prazo de quantidades volumosas de canudos de inseminação artificial em nitrogênio líquido e que recipientes menores e mais portáteis se encontram também disponíveis para proverem o armazenamento de canudos de inseminação artificial em nitrogênio líquido para o transporte para os clientes e/ou para o transporte para uma fazenda apresentando um ou mais animais fêmeas a serem inseminados com o espermatozoide criopreservado.

[00436] Uma vantagem dos métodos de criopreservação descritos aqui é a de que a criopreservação pode ser completada em menos tempo do que o exigido, de acordo com os métodos convencionais. Talvez, associadamente, o declínio na motilidade devido à criopreservação, de acordo com a presente invenção, é apenas de cerca de 5-11%, conforme indicado pelo exemplo discutido abaixo. Dessa forma, a criopreservação, de acordo com a presente invenção, preserva a saúde das células de espermatozoide, conforme indicado pelos testes que mostram que as células de espermatozoide criopreservado de acordo com a presente invenção apresentam mais de 50% (por exemplo, cerca de 60%) de motilidade depois que elas foram descongeladas em um banho de água de 37°C por cerca de 50 segundos. Conforme discutido acima, a motilidade do espermatozoide pode ser analisada por uma máquina automática (por exemplo, o analisador de espermatozoides IVOS da Hamilton-Thorn Research) ou por meio de exame visual.

[00437] Deve ser notado que os métodos de criopreservação descritos acima são contemplados como sendo usados em um processo de separação de espermatozoide de escala comercial. Desse modo, de acordo com uma concretização da presente invenção, as etapas dos mé-

todos da invenção descritos aqui são executadas simultaneamente em uma batelada de células de esperma separadas para rapidamente criopreservar toda a batelada de células de esperma em um maneira que preserve sua saúde. Por exemplo, com o uso do aparelho de citometria de fluxo de múltiplos canais descrito abaixo, é possível se obter cerca de 840×10^6 de células de esperma conduzindo cromossomos X no sistema de coleta do aparelho em cerca de 20 minutos. Esta é uma quantidade de células de esperma suficiente para encher as várias dúzias de canudos. Além disso, uma batelada pode incluir as células de esperma combinadas por dois ou mais citômetros de separação diferentes. Depois de serem concentradas conforme descrito acima, as células de esperma podem ser carregadas em qualquer número de canudos e criopreservadas como uma batelada. Por exemplo, de acordo com uma concretização da invenção, leva cerca de 5 minutos para se acrescentar um extensor (incluindo tanto uma fonte de proteína como um crioprotetor) em uma batelada de células de esperma, e cerca de 15 minutos para carregar as células de esperma em canudos de inseminação artificial usando uma máquina de carregamento automática. Todos os canudos na batelada são resfriados simultaneamente em um congelador programável. Adicionalmente, a capacidade de alguns congeladores programáveis permite a criopreservação simultânea de milhares de canudos de inseminação artificial. Por exemplo, o congelador IceCube 1810CD indicado acima apresenta a capacidade de criopreservar simultaneamente mais de 2.500 canudos de 0,5 ml ou mais de 3.800 canudos de 0,25 ml. Assim poder-se-ia esperar para começar a etapa de resfriamento até que múltiplos lotes tenham sido obtidos. Alternativamente, múltiplas bateladas poderiam ser obtidas substancialmente ao mesmo tempo por meio do funcionamento de múltiplas máquinas de citometria de fluxo de múltiplos canais (vide abaixo) em paralelo e com o resfriamento simultâneo de múltiplas ba-

teladas obtidas a partir das mesmas em um congelador programável. Em uma concretização da presente invenção, leva um período de menos de 220 minutos para resfriar as células de esperma da temperatura ambiente para um estado super-resfriado e imergi-las em nitrogênio líquido (-196°C). Em outra concretização, o período de super-resfriamento é menor do que 190 minutos. Em ainda outra concretização, o período de super-resfriamento é menor que 150 minutos.

[00438] Aqueles versados na técnica irão reconhecer que modificações substanciais podem ser feitas aos métodos exemplificativos anteriores sem se afastar do escopo da presente invenção. Por exemplo, as células de esperma podem ser criopreservadas em um recipiente do que em um canudo de inseminação artificial. Do mesmo modo, as etapas no processo que envolve a mudança ou a manutenção da temperatura podem ser executadas por qualquer meio adequado, incluindo banhos de água, vapores de nitrogênio líquido, e congeladores convencionais programáveis ou não-programáveis, por exemplo. Adicionalmente, uma ampla variedade de substâncias ou combinações de substâncias poderia ser usada como a fonte de proteína e/ou o criopreservador sem se afastar do escopo da presente invenção. Estas substâncias incluem substâncias e concentrações de substâncias listadas acima em conexão com as discussões referentes a tampões, extensores, crioprotetores, fluidos de revestimento, e fluidos de coleta. Além disso, a ordem de algumas etapas no método pode ser variada sem se afastar do escopo desta invenção. Embora a figura 95 indique que o crioprotetor seja acrescentado depois que a concentração dos espermatozoides separados seja ajustado, também é contemplado que um crioprotetor possa ser acrescentado antes que a concentração seja ajustada sem se afastar do escopo da presente invenção. Por exemplo, o crioprotetor pode ser provido no fluido de coleta ou no fluido de revestimento usado em conexão com um citômetro de fluxo. Alguns

dos benefícios da presente invenção poderão também ser obtidos por meio do resfriamento parcial das células de esperma e, então, por meio do acréscimo do crioprotetor. Igualmente, a ordem na qual é acrescentada a fonte de proteína pode ser variada, contanto que a fonte de proteína seja eficaz para proteger as células de esperma do choque frio à medida que elas passam através da faixa de temperatura de cerca de 14 a 8°C.

Exemplo de Criopreservação I

[00439] Sêmen bovino foi coletado, transportado e avaliado, conforme descrito acima. Dois tubos de teste contendo 5 ml cada de tampão TCA (pH 7,3) foram colocados em um dos dois banhos de água por pelo menos cinco minutos. Um banho de água estava em uma temperatura de 35°C e o outro banho de água estava em 41°C. Espermatozóides em 24°C foram acrescentados a cada tubo, de modo que a concentração final em cada tubo fosse de 150×10^6 espermas/ml. Os dois tubos foram cada qual divididos em duas frações que foram mantidas nos respectivos banhos de água. Depois que o esperma equilibrou o tampão TCA por cinco minutos, 80 µM de corante Hoechst 33342 foram acrescentados a uma das frações de 35°C e uma das frações de 41°C. Depois da adição do corante Hoechst 33342, todas as quatro frações foram incubadas por 20 minutos em seu respectivo banho de água. Depois da incubação, os tubos de teste foram removidos dos banhos de água e deixados em uma temperatura ambiente (cerca de 25°C) por cinco minutos. Depois, os conteúdos de cada tubo foram diluídos com um extensor TCA contendo 20% de gema de ovo e 6% de glicerol (v/v) (pH 0,7) em uma concentração final de 20×10^6 espermas/ml. Os conteúdos de cada tubo de teste foram usados então para encher um canudo de inseminação artificial de 0,5 ml. Cada um dos quatro canudos foi colocado em um congelador programável (um congelador IceCube 1810CD da Multitube of America,

WI). A seguinte seqüência de resfriamento foi programada no congelador programável: (1) 22°C a 4°C @ - 0,2°C/min; (2) conservada em 4°C por 30 min; (4) 4°C a - 15°C @ -3,0°C/min; e (4) -15°C a -80°C @ - 10,0°C/min. Depois de atingirem -80°C, os canudos foram imersos em nitrogênio líquido (-196°C) por 45 minutos. Depois, os canudos foram imersos em um banho de água de 37°C por 50 segundos para serem descongelados. A motilidade dos espermatozoides foi verificada de acordo com um microscópio de contraste de fase tanto antes como depois da criopreservação. Os resultados são mostrados na figura 104. A motilidade de pós-descongelamento era geralmente da ordem de 60%. Isto representa um declínio na motilidade de apenas cerca de 5-11% comparado a antes da criopreservação. A análise da variação não revelou qualquer efeito significativo ou do corante Hoechst 33342 ou da incubação em 41°C na motilidade do espermatozoide pós-descongelamento.

OPERAÇÃO DO SISTEMA

[00440] Toda a operação 813 do sistema de citometria de fluxo 9 será agora descrita com referência à figura 82 e no contexto específico das células de espermatozoide (por exemplo, células de espermatozoide bovino), mas será entendido que a descrição é exemplificativa apenas, e que o sistema pode ser usado para processar outros tipos de partículas.

[00441] A primeira série de etapas que levam a um circuito de repetição de seis segundos envolve a calibração do sistema. Depois da inicialização 789, uma verificação do sistema 771 é executada para confirmar, entre outras coisas, que o processador 131 ou os processadores são operacionais. Se um erro for detectado depois de três falhas de verificações de sistema 775, a interação do usuário 773 é solicitada. Se a verificação do sistema for positiva, o microprocessador irá direcionar o sistema para lavar 777 o sistema de bocal com um fluido adequado, e, então, um material de controle de qualidade 779, tais como contas ou núcleos bovinos, é corrido através do sistema para

inicializar os parâmetros de detecção (vide 739 na figura 72) e confirmar que o sistema está operando dentro de um controle de qualidade aceitável. Isto envolve uma avaliação do material de controle para testar a sensibilidade e a precisão do sistema para confirmar que o sistema pode adequadamente discriminar uma amostra. Se o controle de qualidade não for confirmado depois de três tentativas 775, será solicitada a intervenção do usuário 773.

[00442] Se o material de controle de qualidade indicar um nível aceitável de controle de qualidade, uma amostra 781 será aspirada e uma porção ou fração da amostra a ser separada será verificada quanto a qualidade 783. A qualidade de amostra poderá ser determinada por um cálculo de um fator de qualidade (fator Q) da amostra. Por exemplo, o tipo de células pode ser detectado em uma primeira fração da amostra. Durante esta detecção, os parâmetros de detecção inicializados (741) são novamente verificados e os parâmetros de discriminação iniciais (745) são gerados. Se o tipo de células detectadas na fração indicar que a amostra atende ou excede um padrão preestabelecido (por exemplo, que a amostra pode ser discriminada para produzir uma certa pureza ou motilidade e, em particular, que há células X vivas suficientes disponíveis para processamento), então, o sistema continuará a operação. Se a qualidade da amostra falhar três vezes 775, a interação do usuário será solicitada.

[00443] A operação continuada envolve a separação 785 do restante da amostra empregando um circuito repetido de seis segundos. No início do circuito, o microprocessador confirma que a separação da amostra não está completa 789. Se a separação da amostra estiver completa 789, o microprocessador procederá para aspirar a próxima amostra 781, se ela estiver disponível, ou para cancelar a operação de separação 793, se uma amostra adicional não estiver disponível. Se a amostra não estiver completa 799, o microprocessador irá inicialmente

verificar a discriminação X/Y 795 da amostra para confirmar se ela se encontra em uma ótima faixa. Em outras palavras, é conduzida a análise de desvio, conforme notado acima (761 na figura 72). Se forem feitas quaisquer mudanças, tais mudanças serão implementadas, e a discriminação 795 será novamente verificada. Se a discriminação for ainda inaceitável, neste ponto, a separação será desligada 973 e a interação do usuário será solicitada.

[00444] Diferentemente, o sistema prossegue para determinar se o sistema de distribuição de fluido está distribuindo fluido e células em uma taxa que está dentro de uma ótima faixa 801. Esta determinação depende do tipo de estratégia de controle usada. Para uma estratégia de controle de alta recuperação, a ótima taxa seria determinada por meio da avaliação da pureza ou por meio do exame em $x/x+\sim X$ da população coletada. Se a pureza determinada for mais alta do que um nível de pureza exigido, a taxa de entrada de alimentação das células será aumentada com o aumento de um sinal de controle de taxa provido para a bomba de seringa 803. Isto tenderia a aumentar as células coincidentes e diminuir a pureza porque mais células coincidentes incluindo as células $\sim X$ seriam coletadas com as células X. Se a pureza determinada for mais baixa do que a pureza exigida, a taxa de entrada de alimentação das células será diminuída com o decréscimo de um sinal de controle de taxa provido para a bomba de seringa para reduzir a frequência das células coincidentes 803. Desse modo, a taxa de entrada de células é uma função da pureza determinada da população coletada, conforme comparado a um nível de pureza desejado, por exemplo, uma função das células de esperma $\sim X$ identificadas coletadas.

[00445] Para uma estratégia de controle de pureza elevada, a ótima taxa seria determinada com o cálculo das células X perdidas, por exemplo, as células X descartadas/células X descartadas + células X

coletadas. Se a quantidade ou porcentagem das células X for menor do que um nível aceitável, a taxa de entrada das células será aumentada com o aumento de um sinal de controle de taxa provido para uma bomba de seringa 803. Isto tenderia a aumentar as células coincidentes e aumentar o número de células X descartadas porque mais células incluindo as células X seriam descartadas com as células Y. Se a quantidade ou porcentagem das células X perdidas for maior que o nível aceitável, a taxa de entrada das células será diminuída com o decréscimo de um sinal de controle de taxa provido para a bomba de seringa 803 para diminuir as células coincidentes. Desse modo, a taxa de entrada de célula é uma função das células X perdidas determinadas da população descartada, conforme comparado ao número das células X na população coletada, por exemplo, uma função do número das células X não-coletadas.

[00446] Se esta taxa modificada for aceitável 805, o sistema prosseguirá para outra verificação do sistema 807. Se a verificação do sistema for aceitável 807, a separação continuará no circuito de seis segundos. Caso negativo, o sistema será restabelecido 809. Se depois do reestabelecimento, o sistema for aceitável, ou se a taxa de alimentação revisada não for aceitável 811, a separação será cancelada 793 e a intervenção do usuário será solicitada 773.

[00447] Os fluxos de gotículas separados são coletados pelo sistema de coleta 2201. As gotículas que são separadas na população das células X passam através da janela de saída 2245 no primeiro dispositivo de interceptação 2247 para serem interceptadas pelo segundo dispositivo de interceptação 2249. A partir daí, as gotículas contendo as células X fluem para um vaso de coleta 2207. Outras gotículas são interceptadas pelo primeiro dispositivo de interceptação 2247 e direcionadas para a calha de resíduos 2805. Naturalmente, as gotículas interceptadas pelo primeiro dispositivo de interceptação poderiam ser

também salvas, conforme notado acima. Quando uma quantidade adequada de células de esperma conduzindo cromossomos X tiver sido coletada no vaso de coleta, a separação poderá ser interrompida para permitir a concentração das células de esperma no vaso de coleta 2207. Um novo vaso de coleta pode ser colocado sob o primeiro dispositivo de interceptação 2247 ou o fluido coletado pode ser despejado em um recipiente diferente e o vaso de coleta substituído. Depois, a separação pode ser resumida. As células de esperma no fluido coletado são concentradas, carregadas em canudos, e congeladas, conforme descrito acima.

CONTROLE DA TEMPERATURA DURANTE A OPERAÇÃO

[00448] O controle da temperatura por todo o processo pode ser usado para aperfeiçoar os resultados do processo. Conforme já foi discutido acima, a temperatura do esperma pode ser controlada durante várias etapas no processo (por exemplo, tingimento e criopreservação). Em diversas concretizações desta invenção, as temperaturas das células de esperma por todas as várias etapas do método são controladas para se alcançar resultados aperfeiçoados.

[00449] Por exemplo, a figura 105 é um diagrama de fluxo de trabalho de uma concretização de um método de controle de temperatura de acordo com a presente invenção. A temperatura das amostras de sêmen no momento em que elas são coletadas será determinada pela temperatura do corpo do animal do qual elas são coletadas. Por exemplo, na etapa 2601, as amostras de sêmen bovino são coletadas em cerca de 37°C. Um recipiente isolado é usado para o transporte das amostras de sêmen para o laboratório a partir do local de coleta, na etapa 2603. O recipiente isolado retarda o resfriamento do esperma.

[00450] Durante a avaliação da amostra, na etapa 2605, a temperatura é mantida abaixo da temperatura de coleta, mas acima de uma

temperatura correspondente à temperatura de transição de vidro abaixo da qual as células de esperma sofrem de danos de membrana. Por exemplo, a temperatura pode ser mantida na faixa de cerca de 18 - 37°C. Em outra concretização, a temperatura pode ser mantida na faixa de cerca de 24 - 37°C durante a avaliação da amostra. Em uma concretização específica, as células de esperma são colocadas em um ambiente apresentando uma temperatura na faixa de cerca de 22 - 25°C durante a avaliação da amostra. Dependendo da temperatura do esperma com a chegada no laboratório, o efeito de colocá-las em um ambiente apresentando uma temperatura na faixa de cerca de 22 - 25°C pode se dar para continuar o lento resfriamento do esperma, para manter a temperatura do esperma, ou para ligeiramente elevar a temperatura do esperma. Em uma concretização, a temperatura pode ser elevada (por exemplo, a 40°C ou mais) para tingimento, na etapa 2607, conforme discutido na seção de tingimento. Em outra concretização, a temperatura das células de esperma durante a etapa de tingimento pode estar na faixa de cerca de 20-40°C, como é também discutido acima.

[00451] Na etapa 2609, a mistura de sêmen tingida é mantida em um banho de água até tal momento em que a mistura é introduzida em um citômetro de fluxo. A temperatura do banho de água pode ser similar à temperatura usada para a etapa de tingimento. Em uma concretização, a temperatura do banho de água está dentro da faixa de cerca de 40- 47°C. Em outra concretização, a temperatura do banho de água está na faixa de 20 - 37°C. Em ainda outra concretização, a temperatura do banho de água está na faixa de cerca de 20- 25°C. Depois de serem mantidas no banho de água por qualquer período entre um minuto e duas horas, as células de esperma tingidas são separadas pela citometria de fluxo, conforme discutido acima na etapa 2611. Na etapa 2613, as células de esperma coletadas são concentradas. A concen-

tração pode ser executada em um ambiente que apresenta uma temperatura que não irá significativamente mudar a temperatura das células de esperma. Por exemplo, em uma concretização, a concentração pode ser executada em um ambiente apresentando uma temperatura na faixa de cerca de 20 e 25°C. Um extensor, fonte de proteína, e crioprotetor são acrescentados ao esperma concentrado, na etapa 2615. Depois, na etapa 2617, as células de esperma são localizadas em canudos de inseminação artificial. Em uma concretização, a etapa de carregamento é executada em um ambiente apresentando uma temperatura que não irá significativamente mudar a temperatura das células de esperma. Finalmente, na etapa 2619, a temperatura do esperma é controlada durante a criopreservação, conforme discutido acima.

[00452] Em outra concretização, as células de esperma podem ser tingidas em ainda temperaturas inferiores sem se afastar do escopo da presente invenção. Por exemplo, poderá ser desejado separar as células de esperma em um citômetro de fluxo em uma temperatura relativamente baixa (por exemplo, de cerca de 0°C a cerca de 8°C). Isto pode exigir a modificação de todo o controle de temperatura. Primeiro, quando do resfriamento das células de esperma antes da introdução em um citômetro de fluxo, a gema de ovo e outras fontes de proteína comuns que protegem as células de esperma do choque frio em temperaturas abaixo da temperatura de transição de vidro geralmente podem não ser usadas como tais substâncias contendo proteína tendem a entupir e/ou obstruir os fluidos no citômetro de fluxo. Desse modo, é desejável resfriar as células de esperma antes de se executar a etapa de tingimento a fim de tirar vantagem dos protetores de choque frio naturais encontrados no sêmen puro, tal como por exemplo, o fluido seminal. Qualquer tentativa em tingir as células de esperma antes do resfriamento exigiria a adição de tampões para proteger os espermatozoides que diluiriam o sêmen puro e reduziriam a proteção natural contra o

choque frio.

[00453] Conseqüentemente, uma concretização da presente invenção para separar as células de esperma em uma temperatura na faixa de cerca de 0°C a cerca de 8°C inclui a colocação das células de esperma em um ambiente apresentando uma temperatura menor que cerca de 8°C para resfriar as células de esperma a uma temperatura na faixa de cerca de 0°C a cerca de 8°C antes do tingimento. Qualquer método pode ser usado para resfriar as células de esperma, mas é desejável usar um processo que proteja contra as rápidas flutuações de temperatura das células de esperma durante o processo de resfriamento. Por exemplo, em uma concretização, um recipiente contendo as células de esperma é colocado em um banho de água de temperatura ambiente, que, por sua vez, é colocado em um ambiente apresentando uma temperatura menor que cerca de 8°C. Em outra concretização, a temperatura das células de esperma é monitorada e gelo é acrescentado ao banho de água para adicionalmente resfriar as células de esperma. A etapa de tingimento pode ser executada, conforme descrito acima, exceto pelo fato da mistura de tingimento ser submetida a uma temperatura na faixa de cerca de 0°C a cerca de 8°C. Devido à temperatura mais baixa, o período de incubação exigido para tingir as células é consideravelmente mais longo. Uma vez que as células de esperma tenham sido esfriadas a 8°C ou abaixo, é desejável impedir o seu aquecimento. Desse modo, outra concretização da presente invenção é a de operar o citômetro de fluxo em um ambiente apresentando uma temperatura na faixa de cerca de 0°C a cerca de 8°C. Similarmemente, outra concretização da presente invenção é a de coletar as células de esperma separadas em um vaso de coleta que é circundado por um ambiente que apresenta uma temperatura na faixa de cerca de 0°C a cerca de 8°C. Ainda outra concretização da presente invenção é a de acrescentar quaisquer extensores, crioprotetores, tampões,

fontes de proteína, antibióticos, antioxidantes, ou outros aditivos em uma temperatura na faixa de cerca de 0°C a cerca de 8°C. Com relação à adição do crioprotetor, pode ser desejável acrescentar ligeiramente mais do crioprotetor do que seria acrescentado com a separação das células de esperma em uma temperatura na faixa de cerca de 0°C a cerca de 8°C. Assim, em uma concretização específica, um crioprotetor contendo 7% de glicerol (v/v) é acrescentado às células de esperma depois que as células de esperma tenham sido separadas em uma temperatura na faixa de cerca de 0°C a cerca de 8°C.

[00454] O super-resfriamento das células de esperma da temperatura na faixa de cerca de 0°C a cerca de 8°C prossegue, geralmente, conforme descrito na seção de criopreservação acima. Entretanto, as células de esperma precisarão ser mantidas em uma temperatura na faixa de cerca de 0°C a cerca de 8°C por um período de tempo depois da adição do crioprotetor antes do super-resfriamento para permitir que haja tempo para que as células de esperma sejam equilibradas com o crioprotetor. Desse modo, de acordo com uma concretização, as células de esperma podem ser equilibradas com o crioprotetor por um período na faixa de cerca de 30 minutos a cerca de 3 horas. Em outra concretização, as células de esperma podem ser equilibradas com o crioprotetor por um período na faixa de 1 - 2 horas. Em outra concretização específica, as células de esperma podem ser equilibradas com o crioprotetor por um período de cerca de 90 minutos.

[00455] O aparelho e métodos de controle de temperatura convencionais (por exemplo, banhos de água, incubadoras, refrigeradores, e congeladores) podem ser usados para aquecer ou resfriar a amostra para se conseguir ou para manter as temperaturas específicas nas concretizações anteriores da invenção. É entendido que a colocação de uma amostra em um ambiente que apresenta uma temperatura diferente da amostra irá fazer com que a temperatura da amostra mude

com o tempo. Pode ainda haver variações dentro da amostra. Conforme foi mencionado, é desejável mudar a temperatura da amostra gradualmente para ajudar a manter a saúde do esperma. A mudança de temperatura gradual também serve para reduzir a variação de temperatura dentro da amostra. Como é bem-conhecido daqueles versados na técnica, a taxa da mudança de temperatura da amostra será influenciada por muitos fatores, incluindo o volume da amostra, o tamanho e a forma do recipiente de amostra, e a magnitude da diferença de temperatura entre a amostra e o ambiente. Entretanto, aqueles versados na técnica irão prontamente ser capazes de selecionar um método e aparelho apropriados para atingir o controle de temperatura desejado depois de considerar todos os fatores relevantes.

[00456] Aqueles versados na técnica irão reconhecer que há espaço para variação substancial no controle de temperatura exemplificativo sem se afastar do escopo da invenção. Em geral, uma vez que as células de esperma tenham sido resfriadas, é desejável impedir o seu aquecimento. Adicionalmente, as variações de temperatura discutidas acima em conexão com a coleta de amostra, tingimento, separação, coleta de gotículas, concentração, e criopreservação podem ser incorporados em todo o controle de temperatura sem se afastar do escopo da presente invenção. Além disso, o tempo no qual as células de esperma permanecem em qualquer temperatura pode também afetar a saúde dos espermatozoides. Portanto, o processamento, de acordo com a concretização na qual a temperatura é controlada por todo o processo, é desejavelmente completado dentro de uma linha de tempo, conforme discutido abaixo.

LINHA DE TEMPO PARA OPERAÇÃO

[00457] De modo geral, é desejável completar o processo de separação de esperma na quantidade mínima de tempo possível para reduzir os danos aos espermatozoides. Conforme discutido acima, a presente

invenção pode incluir o tingimento em uma temperatura elevada para reduzir o tempo necessário para se tingir as células de esperma. Por exemplo, certas concretizações do método de tingimento aperfeiçoado descrito reduzem o tempo exigido para tingimento para cerca de 10 minutos. Igualmente, o novo citômetro descrito acima pode ser usado para separar as células de esperma em menos tempo do que seria exigido por um citômetro convencional. Por exemplo, um citômetro de fluxo que usa a tecnologia discutida acima pode coletar entre 2.000 e 10.000 células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada por segundo. Adicionalmente, o processo de criopreservação pode ser usado para reduzir o tempo necessário pra completar a criopreservação das células de esperma processadas comparados aos métodos de criopreservação convencionais. Conseqüentemente, uma concretização da presente invenção envolve o processamento de espermas de acordo com todo um método para tirar vantagem de uma ou mais das inovações de economia de tempo para reduzir o tempo exigido para completar todo o processo. Por exemplo, de acordo com uma concretização da presente invenção, uma batelada de células de esperma (por exemplo, uma ejaculação) é coletado de um mamífero macho (por exemplo, um touro), avaliado quanto ao controle de qualidade, tingido, separado de acordo com a característica de DNS específica, carregado em um ou mais recipientes (por exemplo, canudos), e criopreservados dentro de um período de cerca de 12 horas a partir do momento de coleta. Em outra concretização, o período é menor do que cerca de 8 horas. Em outra concretização, o período é menor do que cerca de 6 horas. Em ainda outra concretização, o período é menor do que cerca de 3 horas. Ainda em outra concretização, o período de tempo é menor que cerca de duas horas. Em outra concretização, o período de tempo é menor do que cerca de 1 hora.

APARELHO E MÉTODO DE SEPARAÇÃO DE MÚLTIPLOS CANAIS

[00458] A fim de separar mais espermatozoides em menos tempo, é possível usar mais de uma unidade de citometria em paralelo para separar a mesma amostra de espermatozoides. Uma maneira de se fazer isto é a de simplesmente dividir as células de espermatozoides tingidas em múltiplas frações e correr cada fração através de um citômetro diferente. Entretanto, conforme será discutido abaixo, certas vantagens podem ser obtidas com o projeto de um aparelho que compreende múltiplas unidades de citometria em uma única unidade de citometria integrada de múltiplos canais.

SISTEMA DE MÚLTIPLOS CANAIS QUE COMPARTILHA DE PLATAFORMA INTEGRADA

[00459] As figuras 106-116 mostram uma concretização da invenção que compreende um sistema de citometria de múltiplos canais, geralmente indicado por 1001, onde múltiplas unidades de citometria de fluxo de canal único, indicadas por 1003, são agrupadas entre si como um sistema integrado para produzir produto separado. Quatro de tais unidades são ilustradas nesta concretização específica, embora este número possa variar. As unidades podem ser integradas de diversas maneiras, como com o compartilhamento de uma plataforma integrada que compreende um ou mais dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de partículas 1005; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética 1007; (3) um alojamento comum 1009; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades 1011; (5) uma saída comum 1019 que permite a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade; (6) um sistema comum de distribuição de fluido 1021; (7) um sistema comum de controle de temperatura 1023; (8) uma fonte de energia comum 1025; (9) um sistema comum de recuperação de resíduos 1027; (10) um sistema comum de placa defletora 1029; e (11) um sistema de limpeza comum 1031. Em uma concretização, o sistema inclui todos estes elementos, mas será

entendido que um sistema de múltiplos canais desta invenção pode incluir qualquer combinação de elementos. O uso de elementos comuns é benéfico porque ele permite que o sistema funcione de modo mais eficiente e proveitoso, consiga resultados mais consistentes entre os canais por meio da redução de inúmeras variáveis, facilite qualquer depuração que possa se fazer necessária, e seja econômico. A abordagem de múltiplos canais torna também o sistema de separação mais sensível ao aumento ou à redução proporcional.

[00460] Cada uma das unidades de citometria 1003 apresenta componentes similares a certos componentes do aparelho de citometria de fluxo 9 da concretização anterior e, para conveniência, partes correspondentes são indicadas pelos mesmos números de referência com a adição de um iniciador ('). Em geral, cada unidade compreende um sistema de bocal 101', um suporte para a montagem do sistema de bocal 331', um transdutor 105', e um instrumento óptico de epiluminação 417' para focalizar um feixe de luz 25' no fluxo de fluido 21' que sai do orifício de bocal 103', conforme anteriormente descrito. Cada unidade adicionalmente compreende um fotodetector 117' operável como na primeira concretização para detectar emissões de fluorescência 31' das partículas no fluxo 21' e para converter as emissões 31' em sinais elétricos 701' que são processados para classificação das partículas por uma característica de DNS específica. Cada unidade 1003 é também equipada para classificar as gotículas 33' em diferentes grupos ou populações 123', 125' de acordo com a classificação de partículas contidas nas gotículas 35'. As populações de gotículas separadas pelas unidades são coletadas pelo sistema de coleta 2201.

A. Alojamento Comum e Modularidade

[00461] As unidades de citometria de fluxo são montadas em uma disposição modular em um alojamento comum 1009. Na concretização mostrada nas figuras 106 e 109-113, o alojamento apresenta uma ba-

se 1069 e duas paredes laterais 1071 que se estende para cima a partir da base. As paredes laterais apresentam um par inferior de projeções 1073 para sustentar um painel de cobertura inferior 1075 na frente do alojamento 1077, e um par superior de projeções 1081. Um painel de cobertura inferior 1075 na frente do alojamento 1077 é montado entre as projeções inferiores 1073. As projeções superiores 1081 sustentam um painel de cobertura superior 1083 na parte detrás do alojamento 1085. A parte da frente e detrás do alojamento 1077, 1085 são substancialmente abertas para proverem acesso ao lado de dentro do equipamento. Será entendido que o alojamento 1009 pode ter outras configurações sem se afastar do escopo da invenção. Adicionalmente, será entendido que as várias unidades poderiam ser instaladas em alojamentos separados.

[00462] As unidades de citometria de fluxo 1003 são montadas lado a lado como módulos em uma armação apropriada 1087 no alojamento 1009. Especificamente, os suportes de bocal 331' para o posicionamento dos bocais 101' são desengatavelmente conectados a um barramento transversal 1089 (figura 106) afixada às paredes laterais 1071 do alojamento, e as bases 429' dos instrumentos de epi-iluminação 417' são desengatavelmente presas em uma placa de montagem angulada 1003 que se estende entre as paredes laterais 1071 do alojamento na direção da parte detrás do alojamento 1085 (figura 109), a disposição sendo tal que uma unidade específica possa ser instalada ou removida como um módulo. Esta modularidade facilita a instalação, remoção para manutenção e/ou substituição, e permite que qualquer número de unidades de citometria de fluxo 1003 seja prontamente acrescentado, à medida do necessário ou desejado, para aumentar a capacidade de produtividade do sistema.

B. Sistemas Comuns de Suprimento e Distribuição de Fluido

[00463] O sistema de distribuição de fluido 1021 desta concretiza-

ção é equipado para prover fluidos apropriados a cada uma das unidades de citometria 1003. Conforme ilustrado na figura 108, o sistema geralmente compreende uma bomba 1105 para conduzir fluido transportador 17' de um suprimento comum de fluido de revestimento 1107 sob pressão, um sistema de pressão de gás 1115 para conduzir fluido a partir de um suprimento comum 117 do fluido de revestimento 19' sob pressão, e um sistema de tubulação 1121 para receber os fluidos dos respectivos suprimentos e dispensar os fluidos sob pressão em várias unidades de citometria 1003, conforme necessário. Na concretização específica da figura 116, o suprimento de fluido de revestimento compreende um vaso 1123 contendo um volume adequado de tal fluido (por exemplo, 5 ml). O vaso é preso por um suporte 1125, que pode ser um bloco 1133 apresentando uma cavidade 1135 dimensionada para receber o vaso 1123. O bloco apresenta também uma segunda cavidade 1137 para prender um vaso 1139 que contém um material tampão adequado para condicionamento do sistema durante o uso, conforme será descrito posteriormente.

[00464] A bomba 1105 para dispensar fluido de revestimento do vaso é desejavelmente (mas não necessariamente) uma bomba de seringa 1141, conforme anteriormente descrito. O êmbolo da bomba é móvel através de um curso de admissão para aspirar um volume selecionado de fluido de revestimento 17' do vaso 1139 e através de um curso de descarga para dispensar fluido de revestimento através de uma linha de suprimento 1147 para a tubulação 1177 e daí para vários bocais 101' do sistema. A bomba de seringa é também operável para aspirar fluido do vaso 1139 contendo tampão para bombear o tampão através do sistema em uma maneira a ser descrita. Uma válvula de três vias 1149 controla o fluxo dos fluidos condutor e tampão para e a partir da bomba 1141. A bomba é acionada por um motor de velocidade variável sob o controle do processador 131'. Por meio de exemplo,

a bomba pode ser acionada por um motor escalonador que opera em velocidades seletivamente variáveis para bombear fluido condutor para o sistema de tubulação 1121 em taxas necessárias para se obter a produtividade desejada das unidades 1003. Múltiplas bombas de seringa ou outros tipos de dispositivos de distribuição de fluido podem ser usados no lugar de uma única bomba de seringa.

[00465] Em uma concretização, o suprimento 1117 de fluido de revestimento compreende um vaso 1155, por exemplo, um tanque conectado à tubulação 1177 por meio de uma linha de suprimento 1157. O sistema de pressão de gás 1115 é operável para pressurizar o tanque e compreende uma fonte de gás pressurizado 1161 (por exemplo, ar ou nitrogênio) que se comunica com o tanque através de uma linha de gás 1163 apresentando um regulador 1165 nele para controlar a pressão suprida ao tanque, e uma válvula de duas vias 1167 que, em uma primeira posição, estabelece a comunicação entre o tanque e a fonte de gás, e em uma segunda posição, é operável para ventilar o tanque. O regulador de pressão de gás 1165 é um regulador convencional ajustável para controlar a pressão suprida da fonte de ar. O sistema de pressão de gás 1115 também inclui uma linha de gás 1169 para pressurizar um suprimento 1173 da solução de limpeza (por exemplo, água desionizada em um tanque) que pode ser usada para limpar os circuitos de fluido em uma maneira a ser descrita adiante. O fluxo através da linha de gás é controlado por uma válvula de duas vias 1167 operável da mesma maneira que a válvula 1167.

[00466] Em uma concretização, a tubulação 1177 compreende um bloco laminado 1179 (figura 112) de material apresentando passagens 1181 formadas no mesmo para definir um circuito de escoamento de fluido 1185, tal como aquele mostrado diagramaticamente na figura 116. (As passagens podem ser formadas pela usinagem de ranhuras nas faces das laminações antes da montagem das laminações para

formar o bloco). O circuito de fluido inclui entradas 1189, 1191 conectadas à bomba de seringa 1141 e ao suprimento 1117 de fluido de revestimento, e conjuntos de saída 1193, para prover tais fluidos para as unidades de citometria de fluxo 1003, cada dito conjunto incluindo uma saída de fluido condutor e uma saída de fluido de revestimento. O escoamento através das várias passagens de fluxo 1181 é controlado por válvulas V1-V6 que, em uma concretização, são válvulas operadas por solenóide nos alojamentos conectados ao bloco de tubulação 1179. O bloco é desejavelmente de material substancialmente transparente (por exemplo, plástico acrílico) para facilitar o monitoramento do sistema 1121 e a depuração. Na concretização mostrada, a tubulação 1177 é conectada a um membro de armação 1203 que se estende entre as paredes laterais 1071 do alojamento 1009 adjacente ao fundo do alojamento abaixo dos sistemas de bocal 101'. As entradas e as saídas 1193 da tubulação 1177 podem compreender encaixes 1205 rosqueados no bloco, tais como encaixes de aro e porca desprovidos de flange disponíveis pela Upchurch Scientific, uma divisão da Scivex. Será entendido que o projeto e a construção do circuito de fluido 1185, em geral, e da tubulação 1177, em particular, podem variar sem se afastar do escopo da presente invenção.

[00467] Com referência à figura 116, o circuito de fluido de tubulação 1185 para o fluido de revestimento 17' inclui um reservatório de amostra 1207 para deter um suprimento limitado de fluido condutor (por exemplo, 10 ml). Se o fluido condutor contiver células de esperma, por exemplo, a provisão de tal reservatório perto dos bocais 101' será benéfica para a viabilidade e a motilidade das células de esperma, uma vez que o armazenamento de tais células, mesmo para curtos períodos de tempo, em pequenos espaços, pode ser prejudicial para a motilidade. O escoamento do fluido condutor proveniente do reservatório de amostra 1207 para os bocais 101' é controlado por

uma série de válvulas de duas vias V1A-V1D, uma para cada bocal. Cada válvula V1A-V1D apresenta uma primeira posição que estabelece a comunicação de fluido entre a agulha 1217 do reservatório de amostra e a agulha 157' de um respectivo bocal para a distribuição de fluido condutor 17' na agulha sob pressão gerada por uma bomba de seringa 114, e uma segunda posição que estabelece a comunicação de fluido entre a agulha 1217 e um sistema de resíduos, geralmente indicado por 1221, que é comum a todas as unidades de citometria de fluxo 1003. Na concretização mostrada, o sistema de resíduos 1221 compreende um tanque de resíduos 1223 para deter o material de resíduos, um mecanismo 1225, tal como uma bomba de vácuo para gerar um vácuo no tanque de resíduos, e linhas de resíduos 1227 que conectam as válvulas V1A-V1D e o tanque de resíduos. Uma válvula V3 é provida na linha de resíduos a montante do tanque de resíduos para abrir e fechar a linha de resíduos, conforme necessário. Um filtro hidrofóbico adequado 1233 é provido na linha que conecta o tanque de resíduos 1223 e a bomba de vácuo 1225.

[00468] O circuito de fluido de tubulação 1185 para o fluido de revestimento 19' inclui uma pluralidade de válvulas V2A-V2D. Cada válvula apresenta uma primeira posição que estabelece a comunicação de fluido com o suprimento 1117 do fluido de revestimento no tanque para a distribuição de fluido de revestimento 19' em um respectivo corpo de fluxo 133' através de uma linha de suprimento 1241, e uma segunda posição que estabelece a comunicação de fluido entre o corpo de fluxo e o tanque de resíduos através de uma linha de resíduos 1247. A pressão na qual o fluido de revestimento é dispensado para os corpos de fluxo 133' irá depender da pressão do tanque de revestimento (à medida que controlada pelo regulador 1165) que pode variar de 6,875 a 687,5 kPa (1 a 100 psi), mais desejavelmente de 68,75 a 343,75 kPa (10 a 50 psi), ainda mais desejavelmente de 103,15 a 275

kPa (15 a 40 psi), e ainda mais desejavelmente de cerca de 137,5 a 206,25 kPa (20 a 30 psi).

[00469] Enquanto o uso de um suprimento comum para todas as unidades apresenta várias vantagens, é contemplado que pelo menos algumas das unidades de citometria de fluxo pudessem ser supridas com material de amostra originário das fontes separadas.

C. Suprimento de Energia Comum e Controles de Entrada e Saída

[00470] As unidades de citometria de fluxo 1003 também compartilham de um suprimento de energia comum 1025, de sistemas comuns de distribuição de potência, de uma entrada comum (GUI) 715' para controlar a operação dos canais pelo microprocessador 131', e uma saída comum provida para o microprocessador permitindo a avaliação da operação de um canal com relação a outro canal. Por exemplo, a saída comum inclui a provisão de sinais digitalizados originários de cada sistema de epi-iluminação para o microprocessador para uma indicação da intensidade de fluorescência medida por cada canal, para uma indicação da taxa na qual cada canal está separando partículas, para uma indicação das variações de tingimento (que podem ser indicadas pela diferença de intensidade dos pulsos de fluorescência das células X e Y) e para uma indicação dos limites de decisão 763 usados para cada canal para discriminação entre partículas. Como outro exemplo, a saída comum inclui a provisão de sinais de saída originários dos sensores de ruptura 389' para o microprocessador para uma indicação da localização de ruptura de gotículas 107' de cada canal.

D. Controle de Temperatura Comum

[00471] Opcionalmente, um sistema de controle de temperatura, geralmente indicado por 1257, é provido para regular a temperatura dos conteúdos dos vasos 1123 no bloco de retenção 1133 e a temperatura da tubulação 1177. Tal controle de temperatura reduz a variabilidade do sistema, provendo assim medições mais consistentes entre

os canais e, para certos tipos de células (por exemplo, células de es-
perma), ajudando a manter a viabilidade das células.

[00472] Em uma concretização, o sistema de controle de tempera-
tura 1257 compreende um circuito de escoamento de fluido 1259 que
compreende passagens de fluido 1263 no bloco de retenção 1133 e
passagens de fluido 1269 no bloco de tubulação 1179, e uma unidade
de controle 1265 pra circular um fluido térmico (por exemplo, água)
através do circuito em uma temperatura selecionada. A temperatura é
desejavelmente tal de modo a manter o fluido, especialmente o fluido
condutor, em uma ótima temperatura para maximizar a viabilidade das
células, e, no caso de estarem envolvidas células de esperma, a moti-
lidade do esperma. Uma válvula de interrupção V6 é posicionada no
circuito para controlar o fluxo através do circuito. A unidade de controle
de temperatura pode ser usada para manter as células de esperma na
temperatura desejada antes da separação, conforme discutido acima.

[00473] Todas as válvulas no sistema de distribuição de fluido 1021
são operadas por meios convencionais, tais como solenóides, sob o
controle de um operador ou programação adequada. As várias linhas
de escoamento de fluido que conectam os componentes do sistema
fora do bloco de tubulação 1179 são desejavelmente de tubos de plás-
tico substancialmente transparentes para observação de quaisquer
bloqueios. Por exemplo, os tubos podem ter 1,5875 mm (0,0625 pole-
gadas) de diâmetro externo de polímero FEP. As linhas de escoamen-
to do sistema de controle de temperatura 1257 são desejavelmente um
tanto maior (por exemplo, de 3,175 mm (0,125 polegadas) de diâmetro
externo) para proverem uma maior capacidade de escoamento.

E. Sistema Comum de Feixe de Luz e de Divisão de Feixe

[00474] Conforme anteriormente notado, o sistema de múltiplos ca-
nais compartilha de uma fonte comum de radiação eletromagnética ou
luz de feixe 1007. Por meio de exemplo (e não de limitação), a fonte

pode ser um feixe de laser de um laser UV de múltiplas linhas principalmente apresentando comprimentos de onda de 351,1 nm e 363,8 nm. Alternativamente, pode ser desejável usar um laser pulsado (por exemplo, um laser travado por modo), particularmente para sincronizar a amostragem digital com um laser pulsado (conforme discutido na seção de laser pulsado), a fim de aumentar a potência eficaz dispensada para cada unidade de citometria, aumentando assim o número de citometrias que podem ser operadas com um único laser.

[00475] A potência exigida para gerar o feixe de laser irá variar dependendo das exigências de cada unidade de citometria de fluxo e do número de unidades. Por exemplo, se houver N unidades e cada unidade exigir um feixe de luz apresentando uma potência efetiva de W watts, então, será necessário gerar um feixe de laser apresentando uma potência de $(W \times N) + L$, onde L equaliza a perda de potência do sistema entre os elementos óticos do sistema. O uso de um único laser para suprir todas as unidades de citometria de fluxo é econômico comparado a um sistema que usa múltiplos lasers. Ele também é eficiente e propicia medições mais consistentes de um canal para o próximo, porque não há qualquer variabilidade por conta das diferentes características de feixe (por exemplo, intensidade do feixe, polaridade da luz, divergência do feixe) ou ruído elétrico resultante do uso de múltiplos lasers.

[00476] De acordo com uma concretização da presente invenção, um sistema de divisão e orientação de feixe é usado para dividir um único feixe de laser em três ou mais feixes separados. Conforme mostrado na figura 117, por exemplo, um divisor de feixe 50/50 1270 (isto é, um divisor de feixe que é operável para dividir um único feixe em dois feixes separados apresentando intensidade aproximadamente igual) pode ser usado para dividir um único feixe 25' em dois feixes 1270A, 1270B. Com o uso de um segundo divisor de feixe 50/50 1271

para dividir um dos dois feixes 1270B em dois feixes adicionais 1271A, 1271B, pode-se gerar um total de três feixes 1270A, 1271A, 1271B de um único feixe 25'. Cada feixe pode ser direcionado para o sistema óptico de um citômetro de fluxo, por exemplo, um sistema óptico de epi-iluminação 415', conforme mostrado na figura 117. Poderiam também ser usados divisores de feixe adicionais 50/50 para dividir o único feixe de laser em qualquer número de feixes separados adicionais. Conforme mostrado esquematicamente na figura 118, por exemplo, um terceiro divisor de feixe 1272 pode ser acrescentado a um sistema de divisão de feixe de 3 vias (figura 117), de modo que três divisores de feixe 50/50 1270, 1271, 1272 possam ser usados para dividir um único feixe 25' em quatro feixes separados 1271A, 1271B, 1272A, 1272B. A partir disto, pode-se prontamente apreciar que o único feixe pode ser dividido em qualquer número de feixes separados. Outras disposições de divisão de feixe podem ser usadas para dividir o feixe de fonte de entrada em múltiplos feixes de luz para as várias unidades.

[00477] Uma concretização desejável de um sistema de divisão de feixe é mostrada nas figuras 106 e 109. Um sistema de orientação de feixe 1273 é provido para guiar o feixe comum 1007 para os instrumentos ópticos 417' das várias unidades de citometria de fluxo 1003. Na concretização ilustrada nas figuras 106 e 111, o sistema de orientação 1273 inclui uma montagem de espelho superior 1281 montada na parede lateral 1071 acima da montagem de espelho inferior, e uma série de filtros de reflexão 1283, cada um associado com cada instrumento óptico 417'. A montagem de espelho inferior é operável para refletir um feixe 1007 originário de uma fonte adequada ascendente para a montagem de espelho superior, e a montagem de espelho superior é operável para refletir o feixe através de uma abertura na parede lateral 1071 para os filtros de reflexão 431' dos vários instrumentos 417'.

[00478] Em uma concretização, a montagem de espelho inferior inclui uma base 1285 presa à parede lateral 1071 do alojamento 1009, um estrado 1289 verticalmente móvel na base por um mecanismo adequado 1291, tal como um micrômetro, uma plataforma inclinável 1293 no estrado (por exemplo, um suporte óptico cinemático Modelo P110-P disponível pela Newport), e um espelho 1295 na plataforma, a posição do espelho sendo ajustável pelo movimento do estrado e da plataforma de espelho para as localizações apropriadas. A montagem de espelho superior é similar à montagem inferior, compreendendo uma base 1297, um estrado verticalmente móvel 1299, uma plataforma inclinável no estrado 1301, e um espelho 1303 na plataforma. Um par de placas-alvo 1309 é afixado à parede lateral do alojamento 1009 entre as montagens de espelho superior e inferior. As placas-alvo 1309 apresentam orifício verticalmente alinhados 1311 nas mesmas para facilitar o ajuste dos espelhos superior e inferior, de modo que um feixe de entrada 1007 seja refletido com precisão na direção dos filtros de reflexão 431' dos instrumentos 417', todos os filtros sendo alinhados com o feixe de entrada.

[00479] Cada um dos três primeiros filtros de reflexão 1315, 1317, 1319 funciona como um divisor de feixe, isto é, ele funciona para refletir uma porcentagem específica do feixe e para passar a porcentagem restante do feixe. Por exemplo, no caso de quatro instrumentos de epiluminação, os filtros de reflexão 431' dos três primeiros instrumentos refletem, cada qual, uma porcentagem da luz de laser 1007, de modo que cada das três primeiras unidades da série receba 25% da radiação eletromagnética do feixe original 1107. Por exemplo, os filtros de reflexão das primeira, segunda e terceira unidades podem refletir 25%, 33% e 50% da luz incidente, respectivamente. O último filtro de reflexão 1321 da série desejavelmente reflete toda a luz restante (cerca de 25% do feixe original) para o último instrumento da série. Como resul-

tado, cada um dos quatro instrumentos deve receber a mesma intensidade de radiação (luz) para interrogar as células nos respectivos fluxos.

[00480] Dependendo dos dispositivos de divisão de feixe usados no sistema acima 1273, pode ser desejável que o feixe de laser tenha uma polarização específica. A relação de transmitância-reflectância dos filtros dielétricos pode variar dependendo da polarização da luz. Adicionalmente, quando lida com luz linearmente polarizada, os filtros dielétricos (que são fabricados para uso em um ângulo específico de incidência) podem ser sensíveis demais às variações no ângulo de incidência. A luz circularmente ou elipticamente polarizada alivia este problema até certo ponto porque o vetor de polarização da luz está em uma variedade de orientações diferentes com relação ao eixo óptico de um filtro dielétrico à medida que a luz interage com o filtro. Assim, a luz elipticamente ou circularmente polarizada simula luz aleatoriamente polarizada, que propicia uma maior tolerância para variações no ângulo de incidência em um filtro dielétrico. Conseqüentemente, se o laser descrito acima gerar um feixe de luz apresentando uma polarização vertical, por exemplo, poderá ser vantajoso converter a luz em luz circularmente polarizada antes que ele seja dividido. Conforme será entendido por aqueles versados na técnica, isto poderá ser conseguido com a passagem do feixe através de uma placa (filtro) de retardação de 1/4 de onda do material de polarização apresentando seu eixo óptico girado a 45 graus com relação ao plano da polarização de laser. O feixe transmitido assim pela placa de onda terá polarização aproximadamente circular, e poderá ser mais facilmente dividido para prover múltiplos feixes para os sistemas ópticos das respectivas unidades de citometria de fluxo.

[00481] Além disso, com a rotação da placa de retardação de onda para alterar o ângulo entre a polarização de laser e o eixo óptico do

material usado para formar a placa de onda, a excentricidade poderá ser introduzida na polarização aproximadamente circular do feixe (isto é, a polarização pode se tornar mais elíptica). A mudança da excentricidade da polarização elíptica do feixe pode mudar a relação de transmitância-reflectância dos filtros dielétricos em fazendo com que o vetor de polarização para uma maior porcentagem de luz tenha um ângulo específico com relação ao eixo óptico do filtro dielétrico. Conseqüentemente, se o equilíbrio de luz entre as múltiplas unidades de citometria estiver fora da faixa desejada, poder-se-á girar a placa de onda para aumentar ou diminuir a excentricidade da luz elipticamente polarizada, alterando assim as relações de transmitância-reflectância dos vários filtros até que um melhor equilíbrio seja alcançado. Similarmente, se a placa de onda estiver transmitindo luz elipticamente polarizada, poder-se-á influenciar a relação de transmitância-reflectância de um dos filtros com a rotação desse filtro.

[00482] Não obstante o método usado para dividir o único feixe em múltiplos feixes separados, o equilíbrio da potência distribuída para cada unidade de citometria pode ser alcançada com a seleção do bloqueamento de uma porcentagem da luz para trazer todas as unidades de citometria para o mesmo nível de potência. Por exemplo, o filtro de densidade neutra 447' de cada sistema de epi-iluminação 415' pode ser selecionado para bloquear mais ou menos da luz para equilibrar a potência de iluminação distribuída pelo sistema de divisão e orientação de feixe para cada unidade de citometria individual. Se um canal de uma unidade de múltiplos canais receber iluminação significativamente maior do sistema de divisão e orientação de feixe, um filtro de densidade neutra 467' que transmite menos luz poderá ser usado no sistema de epi-iluminação 415' desse canal para trazer a potência de iluminação para esse canal mais em linha com os outros canais. É desejável, embora não essencial, que as variações de canal para canal na

potência de iluminação sejam menores do que cerca de 10%. É ainda mais desejável que as variações de canal para canal sejam menores do que cerca de 5%.

[00483] Será também apreciado que a varredura por laser pulsado, conforme descrito acima, pode ser desejável para a citometria de fluxo de múltiplos canais. Por exemplo, o laser de UV de múltiplas linhas pode ser substituído por um laser pulsado travado por modo que opera em cerca de 85MHz para permitir que mais canais de citometria de fluxo sejam energizados por um único laser. Por exemplo, a potência de pico provida em cada pulso do laser travado por modo que emite pulsos apresentando uma largura (duração) de cerca de 12 picossegundos em uma frequência de cerca de 85 MHz é aproximadamente 800 vezes a saída de potência média do laser. Desse modo, um laser travado por modo (por exemplo, Vanguard 350 da Spectra-Physics) pode prover energia de iluminação suficiente para operar algumas unidades de citometria (por exemplo, 32 unidades de citometria) enquanto opera em apenas cerca de 350 miliwatts.

F. Placas Defletoras Comuns

[00484] Na concretização mostrada nas figuras 106 e 108-116, o sistema de separação 119' de cada unidade de citometria de fluxo 1003 é substancialmente idêntico ao sistema de separação 119 descrito na primeira concretização, exceto pelo fato das unidades desejavelmente compartilharem de duas placas defletoras comuns 1331 que se estendem através da largura do alojamento 1009 na frente do alojamento. Há vantagens de se usar um conjunto comum de placas defletoras, incluindo uma carga consistente de um canal para o próximo, o uso de um suprimento de energia comum, uma maior área de placa provendo um campo elétrico mais estável e uma deflexão de gotículas mais uniforme, e um ângulo consistente de deflexão para a coleta de amostras separadas. As placas defletoras 1331 são montadas em uma

armação 1333 presa ao alojamento 1009. Alternativamente, placas separadas poderiam ser providas para cada unidade.

G. Sistema de Coleta Comum

[00485] Na concretização mostrada nas figuras 107 e 116, um sistema de coleta comum 2801 inclui dois dispositivos de interceptação para cada unidade de citometria, conforme descrito acima em conexão com o sistema de coleta 2201 para a única unidade. Entretanto, uma armação comum 2803 é provida para deter todos os oito dispositivos de interceptação para que cada unidade de citometria direcione o fluido para uma calha de resíduos comum 2805 do que para um vaso de coleta. A calha de resíduos facilita o descarte de gotículas separadas que contêm partículas de pouco valor (por exemplo, células de esperma conduzindo cromossomos Y para a criação de vacas leiteiras). Se for desejável reter todas as gotículas separadas, a calha de resíduos poderá ser removida e os vasos de coleta poderão ser colocados sob cada dispositivo de interceptação. Os quatro vasos de coleta na concretização mostrada nas figuras 107 e 116 se apóiam em aberturas na superfície de uma bandeja de coleta 2807. Um banho de água comum (não-mostrado) pode ser provido sob a superfície da bandeja de coleta para controlar a temperatura dos conteúdos dos vasos de coleta.

H. Controle de Múltiplos Canais

[00486] As várias unidades de citometria de fluxo são controladas pelo microprocessador 131', (ou por outro sistema de processamento adequado) que desejavelmente apresenta uma entrada comum e uma saída comum, conforme discutido acima.

[00487] Desejavelmente, os parâmetros operacionais de cada unidade de citometria de fluxo 1003 podem ser ajustados independentemente das outras unidades, de modo que tais parâmetros possam ser variados como entre as unidades. Estes parâmetros podem incluir, por exemplo, a frequência da formação de gotículas, as estratégias de

controle e de separação utilizadas por uma unidade específica, os critérios usados para cada unidade para classificar e separar partículas no fluido supridas para a unidade, e outros parâmetros. Por exemplo, em certas situações, pode ser desejável suprir uma ou mais unidades com fluido condutor 17' em uma primeira taxa de fluxo e outras unidades em uma segunda (diferente) taxa de fluxo. Similarmente, pode ser desejável usar uma estratégia de separação de controle (por exemplo, uma estratégia de "alta eficiência") para uma ou mais unidades enquanto usa uma estratégia diferente (por exemplo, uma estratégia de "baixa perda") para outras unidades. Por meio da variação controlada destes parâmetros entre as unidades, com base nos dados históricos e nos dados coleados em uma base de tempo real, a produtividade das unidades pode ser controlada e os resultados do sistema otimizados. A capacidade de operação independente também permite que unidades selecionadas sejam operadas no caso de um número menor do que o número total de unidades for necessário ou estiver disponível.

I. Operação de Sistema de Múltiplos Canais

[00488] A operação do sistema de múltiplos canais desta concretização é similar àquela descrita anteriormente, exceto pelo fato das múltiplas unidades de citometria de fluxo serem adaptadas para conduzirem as operações de citometria de fluxo em paralelo (isto é, durante o mesmo período de tempo ou a sobreposição de períodos de tempo) para uma maior produtividade.

[00489] Antes do início de uma corrida, o sistema de distribuição de fluido 1021 é limpo, caso necessário, com uma solução de limpeza proveniente do tanque 1173 com o movimento da válvula V5 para sua posição de limpeza. O sistema é então condicionado pelo fluido tampão com o uso da bomba de seringa 1141. Durante este procedimento, as válvulas V1A-V1D e V2A=V2D são movidas para estabelecerem

a comunicação com o receptáculo de resíduos 1223 que está sob vácuo. Como resultado, a solução de limpeza e/ou o fluido tampão fluem/flui através do sistema para serem perdidos/perdido. Este processo limpa o sistema 1021, escorva a bomba de seringa 1141 e remove as bolhas de ar do sistema.

[00490] Com a válvula de três vias 1149 adequadamente posicionada, a bomba de seringa 1141 é operada através de um curso de entrada para aspirar uma quantidade de fluido condutor 17' contendo partículas, por exemplo, células de espermatozoides, depois do que a válvula 1149 é movida para estabelecer a comunicação com a tubulação 1177, e a bomba de seringa se move através de um curso de descarga para bombear um volume de fluido condutor para o reservatório de amostra 1207 para enchê-lo. A temperatura do fluido condutor 17' é controlada pelo sistema de controle de temperatura 1257 para manter as células no fluido condutor na temperatura desejada. Com as válvulas V1A-V1D posicionadas para estabelecerem a comunicação com o reservatório de amostra 1207, a operação adicional da bomba de seringa 1141 força o fluido condutor através das linhas para as agulhas das respectivas montagens de bocal para fluir através dos bocais 101', conforme anteriormente descrito. Ao mesmo tempo, e com as válvulas V2A-V2D posicionadas para estabelecerem a comunicação com o tanque de fluido de revestimento 1155, o fluido de revestimento 19' é forçado através das linhas de suprimento para os respectivos corpos de fluxo e através dos bocais, também conforme anteriormente descrito. Este processo continua por um período apropriado de tempo suficiente para bombear um volume adequado de fluido através do sistema 1001. A duração de uma corrida específica irá variar dependendo da quantidade de fluido de revestimento no vaso de suprimento, da taxa na qual o fluido condutor é bombeado através do sistema, e do número de canais no sistema. Por exemplo, uma corrida pode conti-

nuar por apenas um período limitado de tempo (por exemplo, 15 minutos durante o qual cerca de um ml de fluido condutor é dispensado para cada bocal) ou pode continuar indefinidamente, com o suprimento de fluido sendo recarregado, conforme necessário.

[00491] No caso de uma agulha 157' ficar obstruída, a válvula apropriada V1 será movida para estabelecer a comunicação com o receptáculo de resíduos 1223. O fluido de revestimento 19' que entra no corpo de fluxo 133' será então escoado sob a força do vácuo 1225 novamente através da agulha 157' para ser perdido, limpando e desobstruindo assim a agulha. Se houver necessidade de interromper o fluxo de um determinado bocal, as válvulas V1 e V2 serão simplesmente transferidas para suas posições de eliminação de resíduos.

[00492] Embora o sistema descrito aqui com relação às configurações tanto de canal único como de múltiplos canais tenha sido descrito com relação à separação de partículas, tal como a separação das células X e Y, é contemplado que tais partículas incluam quaisquer partículas apresentando diferentes características que possam ser arbitrariamente indicadas como característica A e característica B. Adicionalmente, será entendido que em algumas concretizações, a função de separação pode ser totalmente eliminada, de modo que o aparelho de citometria de fluxo (de canal único ou de múltiplos canais) opera apenas para classificar as partículas e não para separá-las.

[00493] Enquanto o sistema de múltiplos canais é descrito acima no contexto de operação de unidades de citometria de fluxo em paralelo, será entendido que as unidades poderiam também ser operadas em série. Por exemplo, é contemplado que as partículas em um fluxo poderiam ser separadas por uma unidade em múltiplas populações, e que uma ou mais de tais populações separadas poderiam ser então passadas através de uma ou mais de outras unidades em série para executarem as operações de separação adicionais para separar dife-

rentes partículas usando a mesma estratégia de separação ou uma diferente estratégia de separação.

J. Concretização Vertical de Múltiplos Canais

[00494] As figuras 119 e 120 mostram outro sistema exemplificativo de citometria de fluxo de múltiplos canais. Este sistema, geralmente indicado por 4001, compreende quatro unidades de citometria 4009 agrupadas entre si. O sistema de bocal 101', o sistema óptico de epi-iluminação 450', as placas defletoras 629', a estação de amostra 4051, o mecanismo de prevenção de contaminação 4031 e outros componentes de cada unidade 4009 são montados em uma placa de montagem vertical compartilhada 4011. Com referência à figura 120, um único laser 4013 e um sistema de divisão e orientação de feixe 4015, que é substancialmente similar ao sistema de divisão e orientação de feixe 1273 descrito acima, fornece iluminação para cada sistema de epi-iluminação 450'. O laser 4013 passa através de um orifício 4019 (figura 119) em um alojamento comum 4021 contendo o sistema de divisão e orientação de feixe 4115. O sistema de divisão e orientação de feixe 4115 e o sistema de epi-iluminação 450' estão em um lado da placa 4011. A montagem de lente de focalização 491' de cada sistema de epi-iluminação 450' se estende-se através da placa 4011 para o outro lado (similarmente à configuração mostrada no sistema de canal único mostrado nas figuras 26 & 27), no qual é montado o restante dos componentes para as unidades 4009.

[00495] As unidades 4009 são todas orientadas de modo que seus sistemas de bocal 101' direcionem os fluxos de fluido 21' para baixo. Cada unidade 4009 também apresenta um sistema de coleta 4031, que inclui um vaso de coleta 4033 para coletar gotículas 33 contendo uma população desejada de partículas e um recipiente de resíduos 4035 para coletar outras gotículas 33. Um banho de água (não-mostrado) de outro controle de temperatura pode ser usado para con-

trolar a temperatura do vaso de coleta 4033.

[00496] As múltiplas unidades de citometria de fluxo 4009 podem também compartilhar de um suprimento de energia comum (não-mostrados), de uma entrada comum para controlar a operação das unidades (não-mostrada), e de uma saída comum (não-mostrada) que permite a avaliação comparativa da operação das unidades 4009 entre si. Conforme demonstrado pela comparação das duas concretizações de múltiplos canais exemplificativa 1001, 4001, a natureza da plataforma integrada e o compartilhamento das características entre ou dentre as múltiplas unidades de citometria de fluxo em um sistema de múltiplos canais pode ser variada extensivamente sem se afastar do escopo da presente invenção.

IMPACTO DO PROCESSAMENTO DE MÚLTIPLOS CANAIS EM TODO O PROCESSO

[00497] Todo o processo descrito acima pode ser executado com a separação de esperma de múltiplos canais para diminuir o tempo exigido para separar as células de esperma. Com poucas exceções, o método não muda. Uma mudança menor é a que as células de esperma separadas serão coletadas em múltiplos vasos de coleta. Os conteúdos dos múltiplos vasos de coleta poderão ser combinados para concentração, caso desejado. Alternativamente, os conteúdos de cada vaso de coleta podem ser concentrados separadamente. Será apreciado que o tempo exigido para separar uma batelada de células de esperma (por exemplo, uma ejaculação) da coleta para a conclusão da etapa de criopreservação pode ser significativamente reduzido com o uso de múltiplas unidades de citometria para processar a batelada. Por exemplo, se as quatro unidades de citometria operarem em paralelo para processarem a batelada de células de esperma, o tempo exigido para completar a separação será reduzido em aproximadamente um quarto do tempo exigido para separar a batelada com o uso de uma

única unidade de citometria. Assim, com a substituição da etapa de separação de espermatozoides com quatro unidades de citometria operando em paralelo pela etapa de separação de espermatozoides com uma única unidade de citometria, a linha de tempo exemplificativa para a conclusão do método da coleta para a conclusão da etapa de congelamento poderá ser reduzido. O tempo pode ser reduzido ainda mais com o aumento do número de citômetros que operam em paralelo para separar as células de espermatozoide na amostra, submetidos às limitações práticas envolvidas na operação de um sistema paralelo que apresenta mais de quatro de tais unidades. Assim, de acordo com uma concretização da presente invenção, a etapa de separação em todo o processo descrito acima é executada por meio da separação das células de espermatozoide de acordo com uma característica de DNA específica em um aparelho de citometria de fluxo de múltiplos canais. Em ainda outra concretização, um método de processamento de espermatozoides compreende a etapa de separar as células de espermatozoide de acordo com uma característica de DNA específica em um aparelho de citometria de fluxo de múltiplos canais no qual cada canal coleta na faixa de cerca de 2.000 - 10.000 células de espermatozoide apresentando uma característica de DNA desejada por segundo.

Exemplo de Separação de Múltiplos Canais I

[00498] Foi coletado sêmen de touro de um touro sexualmente maduro com o uso de uma vagina artificial, e a amostra foi transportada para uma instalação de tingimento próxima em um recipiente controlado por temperatura em 37°C. No recebimento, o sêmen foi analisado quanto à concentração, à motilidade visual, à motilidade e à motilidade progressiva pelo Analisador de Motilidade Hamilton-Thorn (IVOS), de acordo com procedimentos padrão e bem-conhecidos (Farrel e outros *Theriogenology*, 49(4): 871-9 (março de 1998)).

[00499] Seis tubos de 1 mL de 150×10^6 de espermatozoides/mL de sus-

pensão de esperma foram preparados com a suspensão de uma fração de sêmen em um tampão de TCA nº 2 de 41°C contendo 10mM de piruvato trazendo todo o pH para 7,35. As quantidades variadas de 10 mM de solução em água de corante Hoechst 33342 foram acrescentadas às amostras de espermatozoides para produzir as concentrações de corante finais de 200, 300, 400, 500, 600 & 700 µM de corante Hoechst 33342. Cada uma das seis amostras foi incubada em 41°C por aproximadamente 30 minutos. As amostras foram analisadas pela citometria de fluxo e a %CV da população de células X foi estimada pelo algoritmo de computador iterativo para 200, 300 e 400 µM de amostras de corante Hoechst 3332. A %CV para 300 e 200 µM de corante 33342 foi verificada como estando dentro da faixa aceitável próxima de 1,3%CV. Conseqüentemente, foi determinado que uma concentração de 250 µM de corante Hoechst 33342 seria usada para tingir uma batelada de células de esperma para processamento adicional.

[00500] Dois tubos contendo 2mL cada de 150×10^6 de espermatozoides/mL de suspensão de espermatozoides foram preparados por meio da suspensão de uma fração de sêmen em um tampão de TCA nº2 de 41°C contendo 10mM de piruvato (novamente trazendo todo o PH para 7,35). Depois, 10mM de solução em água de corante Hoechst 33342 foram acrescentados para cada das duas suspensões de esperma para produzir uma concentração de corante final de 250µM de corante Hoechst 33342. As suspensões de esperma foram mantidas em um banho de água de 41°C por 30 minutos. Depois de 30 minutos, as suspensões de espermatozoides foram removidas do banho de água de 41°C e 4µL de 25mg/mL de FD&C nº40 foram acrescentados a uma das suspensões. A outra foi armazenada em temperatura ambiente para prover amostras de comparação para ensaios de avaliação.

[00501] A suspensão de espermatozoides tingida e temperada foi carregada na porta de amostra de um canal de um citômetro de fluxo de sepa-

ração de gotículas de quatro canais. O PBS de Dulbecco foi usado como fluido de revestimento. O citômetro foi equipado com um bocal de orientação, conforme descrito acima, apresentando um orifício de 60 microns. Uma placa defletora semicircular foi instalada perpendicular ao eixo longitudinal do bocal, conforme descrito acima. O transdutor foi operado em 54 KHz e a localização de ruptura de gotículas foi controlada manualmente. Um sistema óptico de epi-iluminação, conforme descrito acima, foi usado para direcionar aproximadamente 25% do feixe de um laser de onda contínuo para intersectar o fluxo de fluido em um ângulo perpendicular. A lente de focalização e coleta apresentava uma abertura numérica 0,65. O feixe foi focalizado em um ponto apresentando uma largura menor que 3 μm para a varredura de ranhura das células de esperma. O processamento de sinal digital foi usado para extrair a diferença crítica do grau de inclinação e a área de pulso para cada forma de onda de pulso detectada. Os parâmetros de classificação para a classificação das células X, células Y e células não-determinadas na CSD bidimensional e no espaço de característica de área de pulso foram manualmente introduzidos no sistema de processamento para classificar as células de esperma de acordo com o teor de cromossomos.

[00502] Os espermatozoides foram separados de acordo com o teor de cromossomos X e Y com o uso de uma estratégia de separação de aceitação de coincidência para a coleta de células X, atribuindo uma probabilidade de 50/50 em que cada espermatozoides não-classificado era uma célula X ou uma célula Y. A taxa de fluido de amostra foi manualmente ajustada para manter a pureza da população de células X coletadas (conforme indicado por GUI) em 85% ou melhor e para manter a taxa de coleta de células X acima de uma taxa mínima. Depois de aproximadamente quinze milhões de espermatozoides X terem sido coletados em um tubo que foi embebido em um fluido de revestimento por pelo

menos uma hora e depois revestido com 0,5mL de 10% de gema de ovo em um tampão de TCA nº2 em pH 7,0, o tubo foi removido e substituído por um tubo adicional que foi similarmente preparado.

[00503] Imediatamente após a remoção de um tubo de coleta do citômetro de fluxo, foi preparada uma amostra de comparação da suspensão de espermatozoides tingida, mas não separada. As amostras separadas e de comparação foram centrifugadas por 7 min @ 750 g em um tubo de 15 mL. Os supernatantes foram removidos com o uso de uma pipeta de transferência para produzir uma concentração de aproximadamente 40 milhões de espermatozoides/mL. O tampão de TCA nº2 de pH 7,0 foi acrescentado às suspensões de espermatozoides para produzir uma concentração final de aproximadamente 20 milhões de espermatozoides/mL. Este processo continuou até que o citômetro de fluxo tivesse produzido quatro tubos de coleta (A2-A5). As amostras separadas e as amostras de comparação "não-separadas" foram avaliadas por IVOS. A amostra separada A3 e a amostra de comparação não-separada foram avaliadas pelo IVOS. A amostra separada A3 e sua amostra de comparação não-separada foram testadas quanto à % de acrosomos intactos pela microscopia de contraste de interferência. Todas as amostras separadas foram contadas pelo hemacitômetro para determinar a taxa de saída de espermatozoides separados por hora. A % de espermatozoides conduzindo cromossomos X foi confirmada pela reanálise de citômetro de fluxo. Os resultados da avaliação IVOS para as amostras de comparação separadas e 'não-separadas' são providos nas figuras 121 (motilidade) e 122 (motilidade progressiva). O número total de espermatozoides separado em cada tubo de coleta é mostrado na figura 123. A taxa de espermatozoides separados por hora para cada período de coleta é mostrada na figura 124. A porcentagem de espermatozoides conduzindo cromossomos X para cada amostra separada é listada na figura 125. Os resultados da avaliação da integridade dos acrosomos foram de 75%

de acrossomos intactos para a amostra separada e 78% para a amostra de comparação não-separada.

[00504] Os resultados demonstram a capacidade técnica de se produzir mais de 5.000 células X separadas por segundo em uma pureza maior que 85% por canal do sistema de citometria de fluxo de múltiplos canais para períodos sustentados. Os resultados também mostram a capacidade técnica para se produzir mais de 7.000 células X por segundo em uma pureza maior que 85% para os períodos sustentados sob condições ideais. Adicionalmente, os resultados indicam que as amostras de células de esperma separadas obtidas por meio de tal separação de citometria de fluxo de alta velocidade sofrerão apenas de ligeiros declínios na motilidade, indicando que os espermatozoides separados apresentarão uma boa fertilidade.

Exemplo de Separação de Múltiplos Canais II

[00505] O sêmen de touro foi coletado de um touro sexualmente maduro com o uso de uma vagina artificial. A ejaculação foi dividida em duas frações. A primeira fração de 250 µL de sêmen foi suspensa em 5mL de Triadyl® de 37°C. A segunda fração, que compreendia o restante da ejaculação, foi suspensa em duas partes de tampão de carbonato de 37°C (pH 6,1-6,2). Ambas as frações foram transportadas em 37°C em um recipiente controlado por temperatura para uma instalação de processamento. Na instalação de processamento, a primeira fração foi fluída em ~120mL de água de 37°C em 200mL de bécher e colocada em um compartimento frio para ser lentamente resfriada até 5°C. A segunda fração foi analisada quanto à concentração, à motilidade e à motilidade progressiva pelo Analisador de Motilidade Hamilton-Thorn (IVSO), de acordo com procedimentos padrões e bem conhecidos, (Farrel e outros *Tneriogenology*, 49(4): 871-9 (março de 1998)).

[00506] Três tubos de 1 mL de 150×10^6 de espermatozoides/mL de sus-

pensão de espermatozoides foram preparados por meio da transferência de subfrações contendo 150 milhões de espermatozoides da segunda fração para tubos vazios, da centrifugação em 500g por 5 min, da remoção dos supernatantes, e da ressuspensão dos pélotes de espermatozoides em 1mL de tampão TCA nº2 de 28°C contendo 10mM de piruvato de pH 7,35. Dez mM de solução em água de corante Hoechst 33342 foram acrescentados a cada um dos três tubos em várias quantidades para a produção de concentrações de corante finais de 100, 150 & 200 µM de corante Hoechst 33342. Cada um dos três tubos foi mantido em 28°C por aproximadamente 60 minutos. Os espermatozoides de cada um dos três tubos foram analisados pela citometria de fluxo e o CV da intensidade de fluorescência total da população X foi determinado para 100, 150, e 200 µM de condições de tingimento de corante Hoechst 33342 usando um algoritmo de computador interativo. Os CVs para os 150 e 200 µM de corante Hoechst 33342 estavam ambos dentro da faixa aceitável perto de 1,3%. Desse modo, foi determinado usar as condições de tingimento incluindo 150 µM de concentração de corante Hoechst 33342 para separação.

[00507] Um tubo contendo 5 mL de 150×10^6 de espermatozoides/mL de suspensão de espermatozoides foi preparado por meio da transferência de uma subfração contendo 750 milhões de espermatozoides da segunda fração, da centrifugação em 500g por 5 min, da remoção do sobrenadante, e da ressuspensão da pélete de espermatozoides no tampão TCA nº2 de 28°C contendo 10mM de piruvato (pH 7,35). Dez mM de solução água de corante Hoechst 33342 foram acrescentados ao tubo em uma quantidade produzindo uma concentração de corante final de 150mM de corante Hoechst 33342. O tubo foi mantido em um banho de água de 28°C por 60 min. Depois de 60 minutos, o tubo foi removido do banho de água de 28°C e 10µL de 25mg/mL FD&C nº40 foram acrescentados.

[00508] A suspensão de espermatozoides agora tingida e temperada foi carregada na porta de amostra de um canal de um sistema de citometria de fluxo de separação de gotículas de múltiplos canais. A suspensão de espermatozoides foi mantida em 28°C. Com o uso de substancialmente os mesmos ajustes de instrumento, conforme indicado no Exemplo de Múltiplos Canais I, os espermatozoides conduzindo cromossomos X & Y foram separados pelo sistema de citometria de fluxo com o uso de uma estratégia de separação de abortagem de coincidência por um período necessário para colocar uma população de células X enriquecidas de aproximadamente dezoito milhões de espermatozoides em um tubo de coleta que foi preparado com o embebedimento com tampão de revestimento por pelo menos uma hora e depois com o acréscimo de 0,5mL de meio de criopreservação de Triladyl® contendo 10mM de piruvato pH 6,6. As células de espermatozoides foram introduzidas no sistema de citometria de fluxo em uma taxa entre cerca de 25.000 e 30.000 células/segundo. Uma população enriquecida de células X foi coletada em uma taxa que varia de 4.500 por segundo a 6.000 por segundo. Quando aproximadamente dezoito milhões de espermatozoides foram separados em um tubo de coleta, o tubo foi removido e substituído por outro tubo que tinha sido similarmente preparado. Imediatamente após a remoção de um tubo de coleta do citômetro de fluxo, a suspensão de espermatozoides separados foi centrifugada por 7 min @ 700g. O sobrenadante foi removido com o uso de uma pipeta de transferência para produzir uma concentração de aproximadamente 100 milhões de espermatozoides/mL. Os meios de criopreservação de Triladyl® contendo 10 mM de piruvato (pH 6,6) foram acrescentados às suspensões de espermatozoides para produzir uma concentração final de aproximadamente 50 milhões de espermatozoides/mL. Este processo continuou até que o citômetro de fluxo tivesse produzido três tubos de coleta (D1-D3). Aproximadamente 52 milhões de espermatozoides foram separados em 259 min produ-

zindo toda uma taxa de coleta de cerca de 12 milhões de espermatozoides X enriquecidos por hora de separação. Os tubos de amostra separados novamente suspensos foram flutuados em ~120mL de água de 28°C em um bécher de 200ml e colocados em um compartimento frio de 5°C para lentamente serem resfriados.

[00509] Depois que as amostras separadas atingiram 5°C, os três tubos de espermatozoides separados foram combinados em um tubo. A amostra acumulada foi analisada pelo IVOS para determinar a % de motilidade, a % de motilidade progressiva, e a concentração. Meios de criopreservação de Triladyl® adicionais contendo 10mM de piruvato pH 6,6 foram acrescentados à amostra para produzirem uma concentração final de aproximadamente 50 milhões de espermatozoides por mL. A % de espermatozoides conduzindo cromossomos X na amostra acumulada separada era de 87%, conforme determinado pela reanálise de citômetro de fluxo. Um sumário da avaliação de IVOS comparado à amostra não-separada da mesma ejaculação é ilustrado na figura 126.

[00510] A amostra separada acumulada e a primeira fração foram carregadas em canudos padrão de 0,25 cc em um compartimento frio de 5°C. Os canudos carregados foram transferidos para um congelador programável e congelados pelo seguinte programa: 5 min @ 5°C, resfriados de 5°C para -12°C @ 4°C/min, resfriados de -12°C a -100°C @ 40°C/min, resfriados de -100°C a -140°C @ 20°C/min, conservados em -140°C. Depois que os canudos atingiram -140°C, eles foram rapidamente removidos do congelador e mergulhados em nitrogênio líquido.

[00511] Canudos descongelados foram analisados por IVOS quanto à % de motilidade e % de motilidade progressiva depois da incubação em 37°C por 30 e 120 minutos. Os resultados originários de um conjunto de dois canudos separados e não-separados são sumarizados na figura 127 e figura 128.

Exemplo de Separação de Múltiplos Canais III

[00512] O sêmen de touro foi coletado de um touro sexualmente maduro com o uso de uma vagina artificial, e a ejaculação foi dividida em duas frações. Uma primeira fração de 250µL de sêmen foi suspensa em 5mL de Triladyl® de 37°C. Uma segunda fração, que compreendia o restante da ejaculação, foi suspensa em duas partes de tampão de carbonato de 37°C (duas partes de 0,097 mol/L de NaHCO₃, 0,173 mol/L de KHCO₃, 0,090 mol/L de C₆H₆O₇.H₂O em água) (pH 6,1-6,2). Ambas as frações foram transportadas em 37°C em um recipiente controlado por temperatura para a instalação de processamento. Na instalação de processamento, a primeira fração foi fluída em ~120mL de água de 37°C em um bécher de 200mL e colocada em um compartimento frio para ser lentamente resfriada a 5°C. A segunda fração foi analisada quanto à concentração, à motilidade e à motilidade progressiva pelo Analisador de Motilidade Hamilton-Thorn (IVOS), de acordo com procedimentos padrão e bem conhecidos (*Theriogenology*, 49(4): 871-9 (março de 1998) de Farrel e outros).

[00513] Dois tubos de 150 x 10⁶ espermatozoides/mL de suspensão de espermatozoides foram preparados por meio da transferência para cada dos dois tubos vazios de uma fração contendo 900 milhões de espermatozoides originários da segunda fração, da centrifugação de cada tubo em 500 X g por 5 minutos, da remoção do sobrenadante de cada tubo, e da ressuspensão de cada pélete de espermatozoides em 6mL de tampão de TCA nº2 de 28°C contendo 10mM de piruvato (pH 7,35). 10mM de solução em água de corante Hoechst 33342 foram acrescentados a cada um dos dois tubos para produzir as concentrações de corante finais de 200µM de corante Hoechst 33342 em um tubo e 400µM de corante Hoechst 33342 no outro tubo. Cada um dos dois tubos foi mantido em 28°C por aproximadamente 120 minutos. Os espermatozoides de cada dos tubos foram analisados pela citometria de fluxo e o CV da intensidade

total de fluorescência da população X foi determinado para os 200 μ M e 400 μ M de condições de tingimento de corante Hoechst 33342 com o uso de um algoritmo de computador interativo. Os CVs para os 200 μ M e 400 μ M de corante Hoechst 33342 estavam ambos dentro da faixa aceitável de cerca de 1,3%. A suspensão de espermatozoides tingidos com uma concentração de 200 μ M de corante Hoechst 3342 foi escolhida para separação. 10 μ L de 25mg/mL de FD&C nº40 foram acrescentados a este tubo de suspensão de espermatozoides tingidos bem antes da separação.

[00514] A suspensão de espermatozoides tingidos foi carregada na porta de amostra de um canal de um sistema de citometria de fluxo de separação de gotícula de múltiplos canais. A suspensão de espermatozoides foi mantida em 28°C. Com o uso de substancialmente os mesmos ajustes de instrumento, conforme mostrado no Exemplo de Múltiplos Canais I, os espermatozoides conduzindo cromossomos X & Y foram separados pelo sistema de citometria de fluxo com o uso de uma estratégia de separação de abortagem de coincidência por um período de tempo necessário para colocar uma população de células conduzindo cromossomos X enriquecidas de aproximadamente dezoito milhões de espermatozoides em um tubo de coleta que foi preparado com o embebimento de um tampão de revestimento por pelo menos uma hora e com o subsequente acréscimo de 0,5mL de meios de criopreservação de Triladyl® (pH 6,6). As células de espermatozoides foram introduzidas no sistema de citometria de fluxo em uma taxa entre cerca de 25.000 e 30.000 células/segundo. Uma população enriquecida de células conduzindo cromossomos X foi coletada em uma taxa que varia de 4.500 por segundo a 6.000 por segundo. Quando aproximadamente dezoito milhões de espermatozoides foram separados em um tubo de coleta, o tubo foi removido e substituído por outro tubo que tinha sido similarmente preparado. Imediatamente após a remoção de um tubo de coleta do citômetro de

fluxo, a suspensão de espermatozoides separados foi centrifugada por 7 min @ 700 X g. O sobrenadante foi removido com o uso de uma pipeta de transferência para produzir uma concentração de aproximadamente 100 milhões de espermatozoides/mL. Meios de criopreservação de Triladyl® (pH 6,6) foram acrescentados às suspensões de espermatozoides para produzir uma concentração final de aproximadamente 50 milhões de espermatozoides/mL. Este processo continuou até que o citômetro de fluxo tivesse produzido dois tubos de coleta (C1-C3). Aproximadamente 35 milhões de espermatozoides foram separados em 193 minutos produzindo toda uma taxa de coleta de 11 milhões de células conduzindo cromossomos X enriquecidas por hora de separação. Os tubos de amostra separados novamente suspensos foram flutuados em ~120mL de água de 28°C em um bécher de 20mL e colocados em um compartimento frio de 5°C para serem lentamente resfriados.

[00515] Depois que as amostras separadas atingiram 5°C, os três tubos de espermatozoides separados foram combinados em um tubo. A amostra acumulada foi analisada pelo IVOS para determinar a % de motilidade, a % de motilidade progressiva, e a concentração. Os meios de criopreservação de Triladyl® adicionais (pH 6,6) foram acrescentados à amostra para produzirem uma concentração final de aproximadamente 50 milhões de espermatozoides por mL. A % de espermatozoides conduzindo cromossomos X na amostra acumulada separada era de 88%, conforme determinado pela reanálise de citômetro de fluxo. Um sumário da avaliação de IVOS comparado à amostra não-separada da mesma ejaculação é ilustrado na figura 129.

[00516] A amostra separada e a amostra não-separada acumuladas (isto é, a primeira fração a partir de cima) foram carregadas em canudos de 0,25 cc padrão no compartimento frio de 5°C. Os canudos carregados foram transferidos para um congelador programável e congelados pelo seguinte programa: 5 min @ 5°C, resfriados de 5°C a -12°C

@ 4°C/min, resfriados de -12°C a -100°C @ 40°C/min, resfriados de -100°C a -140°C @ 20°C/min, conservados em -140°C. Depois que os canudos atingiram -140°C, eles foram rapidamente removidos do congelador e mergulhados em nitrogênio líquido.

[00517] Os canudos descongelados foram analisados pelo IVOS quanto à % de motilidade e à % de motilidade progressiva depois da incubação em 37°C por 30 e 120 minutos. Os resultados de um conjunto de canudos separados e não-separados são sumarizados nas figuras 130 e 131.

Exemplo de Separação de Múltiplos Canais IV

[00518] O sêmen de touro foi coletado de um touro sexualmente maduro com o uso de uma vagina artificial, e a ejaculação dividida em duas frações. A primeira fração de 250µL de sêmen foi suspensa em 5 mL de Triladyl® de 37°C. A segunda fração, que compreendia o restante da ejaculação, foi suspensa em duas partes de tampão de carbonato de 37°C (duas partes de 0,097 mol/L de NaHCO₃, 0,173 mol/L de KHCO₃, 0,090 mol/L de C₆H₆O₇·H₂O em água)(pH 6,1-6,2) e conservadas em CO₂. Ambas as frações foram transportadas em 37°C em um recipiente controlado por temperatura para a instalação de processamento. Na instalação de processamento, a primeira fração foi flutuada em ~120mL de água de 37°C em um bécher de 200mL e colocada no compartimento frio para ser lentamente resfriada a 5°C. A segunda fração foi analisada quanto à concentração, à motilidade e à motilidade progressiva pelo Analisador de Motilidade Hamilton-Thorn (IVOS), de acordo com procedimentos padrão e bem conhecidos (*Theriogenology*, 49(4): 871-9 (março de 1998) de Farrell e outros).

[00519] Um tubo de 5mL de 150 x 10⁶ de espermatozoides/mL de suspensão de espermatozoides foi preparado por meio da transferência de uma fração contendo 750 milhões de espermatozoides da segunda fração (pH 6,1-6,2) para um tubo vazio e por meio do acréscimo de tampão de carbo-

nato de 28°C (pH 7,35) em um volume final de 5 ml. Para esta suspensão de espermatozoides, 10mM de solução em água de corante Hoechst 33342 foram acrescentados para produzirem uma concentração de corante final de 150µM de corante Hoechst 33342. A suspensão foi conservada em 41°C sob CO₂ por aproximadamente 40 minutos e então colocada em 28°C para separação. Dez µL de 25mg/mL de FD&C nº40 foram acrescentados ao tubo de suspensão de espermatozoides tingida antes da separação.

[00520] A suspensão de espermatozoides tingida foi carregada na porta de amostra de um canal de um sistema de citometria de fluxo de separação de gotículas de múltiplos canais. A suspensão de espermatozoides foi mantida em 28°C. Os espermatozoides conduzindo cromossomos X & Y foram separados pela citometria de fluxo com o uso de uma estratégia de separação de abortagem de coincidência por um período de tempo necessário para colocar uma população de células conduzindo cromossomos X enriquecida de aproximadamente dezoito milhões de espermatozoides em um tubo de coleta que tinha sido preparado com o embebedimento com um tampão de revestimento por pelo menos uma hora e com o subsequente acréscimo de 0,5mL de meios de criopreservação de Triladyl® (pH 6,6). As células de espermatozoides foram introduzidas no sistema de citometria de fluxo em uma taxa entre cerca de 25.000 e 30.000 células/segundo. Uma população enriquecida de células conduzindo cromossomos X foi coletada na taxa que varia de 4.500 por segundo a 6.000 por segundo. Quando aproximadamente dezoito milhões de espermatozoides foram separados em um tubo de coleta, o tubo foi removido e substituído por outro tubo que tinha sido similarmente preparado. Imediatamente após a remoção de um tubo de coleta do citômetro de fluxo, a suspensão de espermatozoides separados foi centrifugada por 7 min @ 700 X g. O sobrenadante foi removido com o uso de uma pipeta de transferência para produzir uma concentração de aproxima-

damente 100 milhões de espermatozoides/mL. Meios de criopreservação de Triladyl® e de piruvato (pH 6,6) foram acrescentados às suspensões de espermatozoides para produzirem uma concentração final de aproximadamente 50 milhões de espermatozoides/mL. Este processo continuou até que o citômetro de fluxo tivesse produzido dois tubos de coleta (C2-C3). Os tubos de amostra separada novamente suspensas foram fluídos em ~120mL de água de 28°C em um béquer de 200mL de colocados em um compartimento frio de 5°C para serem lentamente resfriados.

[00521] Depois que as amostras separadas atingiram 5°C, os dois tubos de espermatozoides separados foram combinados em um tubo. A amostra acumulada foi analisada pelo IVOS para determinar a % de motilidade, a % de motilidade progressiva, e a concentração. Meios de criopreservação de Triladyl® e de piruvato adicionais (pH 6,6) foram acrescentados à amostra para produzirem uma concentração final de aproximadamente 50 milhões de espermatozoides por mL. Um sumário da avaliação IVOS comparado à amostra não-separada da mesma ejaculação é ilustrado na figura 132.

[00522] A amostra separada e a amostra não-separada acumuladas (isto é, a primeira fração a partir de cima) foram carregadas em canudos de 0,25 cc padrão no compartimento frio de 5°C. Os canudos carregados foram transferidos para um congelador programável e congelados pelo seguinte programa: 5 min @ 5°C, resfriados de 5°C a -12°C @ 4°C/min, resfriados de -12°C a -100°C @ 40°C/min, resfriados de -100°C a -140°C @ 20°C/min, conservados em -140°C. Depois que os canudos atingiram -140°C, eles foram rapidamente removidos do congelador e mergulhados em nitrogênio líquido.

[00523] Os canudos descongelados foram analisados pelo IVOS quanto a % de motilidade e % de motilidade progressiva imediatamente depois do descongelamento e depois da incubação em 37°C por 30

minutos. Os resultados de um conjunto de canudos separados e não-separados são sumarizados nas figuras 133 e 134.

SISTEMA DE BOCAL DE TUBO CAPILAR

[00524] A figura 135 ilustra um sistema de bocal alternativo, geralmente indicado por 1335, similar àquele descrito, exceto pelo fato de um tubo capilar 1337 (de quartzo ou sílica fundida, por exemplo) ser conectado ao bocal 137, de modo que o fluido que sai do orifício de bocal 103 seja direcionado para e através do tubo. O sistema óptico 109 do citômetro de fluxo é opticamente acoplado à lateral do tubo em uma maneira adequada, como por uma câmara 1341 enchida com um meio de transmissão de luz, tal como óleo ou gel, apresentando um índice conhecido de refração. O uso de um tubo capilar, comparado ao jato do fluxo de fluido através de um espaço aberto, tem o benefício de reduzir a concentração do fluxo 21 devido à energia acústica suprida pelo transdutor 105, e de permitir que a lente de focalização 1343 seja posicionada imediatamente adjacente ao fluxo de fluido para aumentar a resolução dos sinais de emissão.

[00525] Depois que as partículas foram interrogadas e classificadas, elas podem ser separadas com o uso de quaisquer técnicas convencionais conhecidas daqueles versados na técnica, como com o uso de um dispositivo de ligação de fluido mostrado na figura 137 ou outros dispositivos adequados, tais como sistemas por fotodeterioração ou sistema de separação de gotículas.

TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO DIFERENTES DA SEPARAÇÃO DE GOTÍCULAS

SEPARAÇÃO POR FOTODETERIORAÇÃO

[00526] Os aperfeiçoamentos de citometria de fluxo desta invenção são aplicáveis não apenas à separação de célula de gotículas, conforme descrito acima, mas também a outras técnicas de separação, tal como a separação por fotodeterioração (ablação a laser). A separação

por fotodeterioração é discutida na Patente Norte-americana Nº 4.395.397, que é aqui incorporada para referência em sua totalidade. A figura 136 esquematicamente ilustra uma concretização de um sistema por fotodeterioração de citometria de fluxo de canal único, geralmente indicado pelo número de referência

[00527] Conforme mostrado na figura 136, o sistema de separação por fotodeterioração 1351 é similar ao sistema de separação de gotícula da figura 2, e partes correspondentes são indicadas pelos números de referência correspondentes com a adição de um iniciador duplo ("). Em geral, o sistema compreende os mesmos componentes que o sistema da figura 2, exceto pelo dado dos componentes de separação de gotícula serem eliminados (por exemplo, o transdutor 105, o dispositivo de carregamento 627, as placas defletoras 629, e fontes de energia associadas 635). Em vez disso, estes componentes são substituídos por um laser 1353 ou dispositivo similar que é responsivo às instruções recebidas do microprocessador 131" para remover as partículas indesejadas no fluxo de fluido 21". Como resultado, o fluxo coletado em um receptáculo de coleta 1355 contém uma população desejada de partículas. Por exemplo, se as partículas que são analisadas são células de esperma e o resultado pretendido é o de coletar as células de esperma apresentando uma característica A (por exemplo, um teor de cromossomos desejado), então, o microprocessador receberá sinais do sistema de epi-iluminação 415" que identifica as células não apresentando a característica A e seletivamente ativará o laser para remover tais células ou, de outro modo, torná-las ineficazes.

[00528] Diferentes estratégias de separação de controle podem ser empregadas em um sistema por fotodeterioração, que incluem estratégias de separação de "alta recuperação" e de "alta pureza" discutidas acima no contexto de um separador de gotículas. Em um sistema por fotodeterioração, as partículas contidas no fluxo de fluido são es-

paçadas em vários intervalos ao longo do fluxo e geralmente seguem uma depois da outra em uma única fila. As partículas apresentam diferentes características, algumas apresentando uma característica A, por exemplo, e outras apresentando uma característica B. A seqüência de partículas é aleatória; assim, vistas como uma marcha contínua, as partículas podem ser divididas em diferentes séries de partículas, uma depois da outra, incluindo uma primeira série de partículas que consiste apenas em uma ou mais partículas apresentando a característica A, uma segunda série de partículas consistindo apenas em uma ou mais partículas apresentando a característica B e uma terceira série de partículas consistindo em duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresentando a característica A e pelo menos uma das quais apresentando a característica B. O último (terceiro) grupo geralmente corresponde às partículas estritamente espaçadas em uma gotícula "coincidente" discutida anteriormente, pelo menos para separar finalidades de estratégia. Desse modo, duas ou mais partículas no terceiro grupo podem ser estritamente espaçadas no sentido em que a separação espacial entre as partículas é insuficiente para permitir a discriminação/classificação precisa das partículas, ou porque tal separação é insuficiente para permitir que uma partícula na série seja removida pelo laser sem danificar a(s) outra(s) partícula(s) na mesma série. Em qualquer caso, podem ser removidas ou não removidas as partículas estritamente espaçadas em cada partícula da terceira série de partículas (ou pelo menos em algumas delas), dependendo da estratégia de separação empregada. Deve ser notado que múltiplas partículas em uma primeira série ou múltiplas partículas em uma segunda série poderiam ser "estritamente espaçadas", mas, uma vez que as partículas em tal série apresentam a mesma característica (A ou B), elas são tratadas como uma série de partícula única, pelo menos para fins de estratégia de separação.

[00529] O sistema por fotodeterioração pode ser um sistema de canal único ou um sistema de múltiplos canais, conforme descrito acima.

SEPARAÇÃO DE LIGAÇÃO DE FLUIDO

[00530] É contemplado que os princípios desta invenção podem também ser aplicados aos sistemas de citometria de fluxo que usam técnicas de ligação de fluido, conforme escrito, por exemplo, nas Patentes Norte-americanas N^{os} 6.432.246 (Adair), 4.756.427 (Göhde e outros), e 3.791.517 (Friedman), que são aqui incorporadas para referência em sua totalidade. A figura 137 é uma vista parcial que mostra tal sistema, geralmente indicado por 1357. Ele é substancialmente idêntico ao sistema mostrado na figura 2, exceto pelo fato do sistema de bocal 101" incluir um tubo capilar 1369 (por exemplo, vide figura 135), e o sistema de separação compreende um dispositivo de ligação de fluido 1359 acoplado ao tubo capilar 1369 a jusante a partir da localização de interrogação 115'. A construção e a operação do dispositivo de ligação de fluido podem incorporar qualquer tecnologia de ligação de fluido convencional, tal como descrito nas patentes acima mencionadas. Em geral, o dispositivo funciona para separar partículas desejadas de partículas indesejadas em resposta às instruções recebidas do processador pelas porções intermitentemente desviadas do fluxo de fluido contendo as partículas desejadas/indesejadas ao longo de percursos de fluxos separados 1361, 1365 para a coleta em vasos ou semelhantes. A transferência é comumente conseguida pelo acionamento seletivo de um transdutor 1367 em um dos percursos de fluxo.

[00531] As várias estratégias de separação descritas acima em relação à separação de gotículas e à separação por fotodeterioração podem ser também empregadas em um sistema de ligação de fluido. No sistema de ligação de fluido, as partículas contidas no fluxo de fluido são também espaçadas em vários intervalos ao longo do fluxo, seguindo geralmente uma depois da outra em uma única fila. As partícu-

las apresentam características diferentes, algumas apresentando uma característica A, por exemplo, e outra apresentando uma característica B, a seqüência das partículas sendo aleatória. Por isso, conforme discutido acima em relação ao sistema por fotodeterioração, a marcha de partículas pode ser dividida em diferentes séries de partículas, uma depois da outra, incluindo uma primeira série de partículas compreendendo uma ou mais partículas apresentando a característica A, uma segunda série de partículas compreendendo uma ou mais partículas apresentando a característica B e uma terceira série de partículas compreendendo duas ou mais partículas estritamente espaçadas pelo menos uma das quais apresentando a característica A e pelo menos uma das quais apresentando a característica B. O último (terceiro) grupo geralmente corresponde às partículas estritamente espaçadas em uma gotícula "coincidente" discutida anteriormente, pelo menos para fins de estratégias de separação. Assim, as duas ou mais partículas no terceiro grupo podem ser estritamente espaçadas no sentido em que a separação espacial entre as partículas é insuficiente para permitir a discriminação/classificação das partículas, ou porque tal separação é insuficiente para permitir que uma partícula na série seja desviada pelo dispositivo de ligação de fluido separada da outra partícula na mesma série. Em qualquer caso, as partículas estritamente espaçadas em cada partícula (ou pelo menos em algumas) da terceira série de partículas podem ser desviadas para uma localização de coleta ou outra, dependendo da estratégia de separação empregada. Conforme explicado acima em conexão com a separação por fotodeterioração, múltiplas partículas em uma primeira série ou múltiplas partículas em uma segunda série poderiam ser "estritamente espaçadas", mas, uma vez que as partículas em tal série apresentam a mesma característica (A ou B), elas são tratadas como uma série de partícula única para fins de estratégia de classificação.

[00532] O sistema de ligação de fluido pode ser um sistema de canal único ou um sistema de múltiplos canais, conforme descrito acima.

SEPARAÇÃO DE INTERFERÊNCIA DE GOTÍCULAS

[00533] Também é contemplado que a tecnologia desta invenção pode ser usada em conjunção com uma técnica de transferência fluídica de interferência de gotícula. Por exemplo, um sistema de separação de interferência de gotícula de alta velocidade 1371, mostrado esquematicamente na figura 138, pode ser usado para separar partículas com o desvio de segmentos selecionados do fluxo de revestimento e condutor axial.

[00534] Em contraste a algumas outras técnicas de separação, a técnica de separação de interferência de gotícula não exige que o fluxo de revestimento e condutor coaxial seja formado em gotículas. Portanto, não há qualquer necessidade de acoplar o sistema de bocal 101" usado para a distribuição dos fluidos de revestimento e condutor com um sistema de geração de gotículas. Por meio de exemplo apenas, a passagem dos fluidos de revestimento e condutor através de um sistema de bocal em 414 kPa (60 psi) para criar um fluxo de diâmetro de 50 microns é uma disposição adequada para a formação de um fluxo de fluido coaxial laminar para a distribuição de partículas no sistema de separação de interferência de gotículas. As partículas no fluxo de fluido coaxial são analisadas e classificadas pelo sistema óptico 109" e pelo processador 131" à medida que elas se movem através da localização de interrogação 115", como foi descrito acima para os outros sistemas de separação. A separação ocorre a jusante da localização de interrogação, em uma localização onde o fluxo de fluido coaxial intersecta um fluxo de interferência de gotícula de alta velocidade 1373.

[00535] O fluxo de interferência de gotículas 1373 é gerado por um sistema de geração de gotículas 1375 similar ao sistema de geração

de gotículas usado para a separação de gotículas. Um fluxo de fluido de alta velocidade 1379 passa através de um sistema de bocal de alta velocidade 1377 que é acoplado a um transdutor piezelétrico 1381 ou à outra fonte de energia acústica para fazer com que o fluxo de fluido de alta velocidade se rompa em gotículas 1383 a jusante a partir do bocal de alta velocidade. Por exemplo, um fluido isento de partículas em 10 MPa (1500 psi) pode ser passado através do bocal de alta velocidade para formar um jato de fluido de alta velocidade de 70 microns de diâmetro. O bocal de alta velocidade pode ser oscilado em 400 KHz para formar gotículas de alta velocidade. As gotículas de alta velocidade 1833 passam através de um campo elétrico gerado por uma ou mais placas de deflexão elétricas 1387, de modo que o percurso das gotículas de alta velocidade possa ser controlado pela aplicação seletiva de uma carga elétrica às gotículas, como foi feito para controlar o percurso das gotículas no sistema de separação de gotículas. O fluxo de interferência de gotículas de alta velocidade é direcionado de modo que algumas gotículas de alta velocidade interceptem o fluxo de fluido coaxial em um ponto 1399 a jusante da localização de interrogação. Por exemplo, as gotículas não-carregadas 1389 podem ser direcionadas para colidirem com o fluxo de fluido, enquanto as gotículas carregadas 1391 são defletidas longe do fluxo de fluido coaxial. Quando uma gotícula de alta velocidade colidir com o fluxo de fluido coaxial, um segmento 1397 do fluxo de fluido e quaisquer partículas contidas aí serão desviados do percurso que eles teriam de outra maneira tomado. A aplicação de uma carga ou de nenhuma carga a uma gotícula de alta velocidade pode ser sincronizada, de modo que a chegada dessa gotícula na interseção 1399 com o fluxo de fluido coaxial coincida com a chegada de um segmento específico do fluxo de fluido coaxial. Assim, com o carregamento seletivo de gotículas de alta velocidade dependendo da classificação de partículas contidas dentro dos

segmentos de fluxo de fluido, pode-se separar partículas com o desvio de todos os segmentos de fluxo de fluido coaxial, ou vice-versa. Os capilares de coleta 1403 apresentando um ligeiro vácuo podem ser usados para coletar os segmentos de fluxo coaxial desviados 1397 como não-desviados. O sistema de separação de interferência de gotículas pode ser configurado, de modo que as gotículas de alta velocidade se juntem aos segmentos de fluxo coaxial desviados ou de modo que as gotículas de alta velocidade permaneçam separadas dos segmentos de fluxo desviados depois da colisão com os segmentos de fluxo coaxial.

[00536] Devido ao fato de não haver quaisquer partículas ou células no fluxo de interferência de gotícula de alta velocidade 1373, é possível usar pressões muito altas e frequências de gotículas muito altas sem danificar as partículas ou células a serem separadas. Isto permite a separação de segmentos de fluxo, cada qual apresentando menos volume (por exemplo, quatro vezes menos volume) do que o volume de uma gotícula no sistema de separação de gotículas. Isto aumenta grandemente a produtividade máxima do sistema, enquanto também reduz o fator de diluição das partículas separadas. Além disso, devido ao fato do líquido finamente filtrado sem quaisquer células ou partículas ser usado para formar o fluxo de interferência de gotículas, uma formação de gotículas mais consistente é possível porque o bocal de formação de gotículas menos provavelmente ficará obstruído ou sofrerá de acúmulo de proteína do que o sistema de bocal usado no sistema de separação de gotículas. Outra vantagem é a de que a distância entre a análise de partícula na localização de interrogação e o ponto de separação 1399 pode ser reduzida (por exemplo, por um fator de quatro), permitindo um prognóstico mais preciso do tempo de chegada de uma partícula específica ao ponto de separação. Adicionalmente, o sistema de interferência de gotícula permite mais flexibilidade no ajus-

te do tamanho ou da pressão do bocal para o fluxo de fluido coaxial. Caso desejado, o sistema de separação de interferência de gotícula pode ser combinado com o sistema de bocal de tubo capilar. Um sistema de separação de interferência de gotículas de múltiplos canais pode usar uma bomba fluídica de alta pressão para suprir múltiplos bocais de geração de fluxo de interferência de gotículas com o fluido de um suprimento de fluido comum.

[00537] Quando da introdução de elementos da presente invenção ou a(s) concretização(ões) da mesma, os artigos "um" (e seus derivativos), "o"(e seus derivativos), e "dito" (e seus derivativos) se destinam a indicar que há um ou mais dos elementos. Os termos "compreendendo"/"que compreende(m)", "incluindo"/"que inclui(em)" e "apresentando"/"que apresenta(m)" se destinam a ser inclusivos e indicam que pode haver elementos adicionais diferentes dos elementos listados. O termo "ou" se destina a incluir "e/ou" e se destina a indicar "um ou outro, ou ambos". Assim, uma indicação de "ABC ou DEF" indica (1) ABC, ou (2) DEF, ou (3) tanto ABC como DEF. O termo "e/ou" se destina a ter o mesmo significado que "ou", conforme definido acima. Assim, o termo "e/ou" se destina a incluir "ou " e se destina a indicar "um ou outro, ou ambos". Por exemplo, uma indicação de "ABC e/ou DEF" indica (1) ABC, ou (2) DEF, ou (3) tanto ABC como DEF.

[00538] Em vista do acima, será visto que os vários objetivos da invenção são alcançados e outros resultados vantajosos obtidos.

[00539] À medida que diversas mudanças poderiam ser feitas nas construções, produtos, e métodos acima sem se afastar do escopo da invenção, pretende-se que todo o assunto contido na descrição acima e mostrado nos desenhos anexos seja interpretado como ilustrativo e não em um sentido limitativo.

COMENTÁRIOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DA INVENÇÃO

[00540] Aqueles versados na técnica irão reconhecer que a inven-

ção descrita acima inclui muitos aspectos inventivos, incluindo pelo menos o seguinte:

A. Aparelho de Separação de Múltiplos Canais

[00541] A1. Sistema de múltiplos canais para separar partículas de acordo com uma característica das partículas, o dito sistema compreendendo:

[00542] múltiplas unidades de citometria de fluxo, cada uma das quais sendo operável para separar uma população desejada de partículas em uma mistura de partículas por meio da interrogação de um fluxo de fluido contendo as ditas partículas com o uso de um feixe de radiação eletromagnética,

[00543] as ditas unidades compartilhando de uma plataforma integrada que compreende pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de partículas; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética; (3) um alojamento comum; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (5) um processador comum para receber e processar a informação proveniente das unidades; e (6) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar fluido contendo as ditas partículas para as ditas unidades de citometria de fluxo.

[00544] A2. Sistema de A1, no qual as ditas partículas são células.

[00545] A3. Sistema de A1, no qual as ditas partículas são células de esperma.

[00546] A4. Sistema de A1, no qual o dito sistema compreende pelo menos o elemento (2), e no qual uma ou mais das ditas múltiplas unidades de citometria de fluxo compreendem uma unidade de citometria de fluxo de separação de gotícula de jato no ar.

[00547] A5. Sistema de A1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos os elementos (2) e (3).

[00548] A6. Sistema de A1, no qual a dita plataforma integrada

compreende pelo menos os elementos (4) e (5).

[00549] A7. Sistema de A1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (2), a dita fonte comum compreendendo um único feixe de laser.

[00550] A8. Sistema de A7, que adicionalmente compreende um sistema de divisão de feixe para dividir a único feixe de laser em múltiplos feixes e direcionar os múltiplos feixes para sistemas ópticos das respectivas unidades de citometria de fluxo.

[00551] A9. Sistema de A8, no qual o dito único feixe de laser compreende uma pluralidade de pulsos, cada pulso apresentando uma potência de pico que é maior do que a saída de potência média do laser.

[00552] A10. Sistema de A1, no qual a dita plataforma integral compreende pelo menos um elemento (3), as ditas unidades de citometria de fluxo compreendendo módulos intercambiáveis removivelmente montados no alojamento.

[00553] A11. Sistema de A1, no qual cada unidade de citometria de fluxo compreende um sistema óptico de epi-iluminação para interrogar um respectivo fluxo de fluido.

[00554] A12. Sistema de A1, que adicionalmente compreende um sistema de coleta para coletar a dita população desejada de partículas originárias de cada unidade.

[00555] A13. Sistema de A1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (5), e no qual a dita saída comum compreende uma indicação da intensidade de fluorescência medida por cada unidade.

[00556] A14. Sistema de A1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (5), e no qual a dita saída comum compreende uma indicação da taxa na qual cada unidade está separando as partículas.

[00557] A15. Sistema de A1, no qual a dita plataforma integrada

compreende pelo menos um elemento (5), e no qual a dita saída comum compreende uma indicação das variações de tingimento de partícula.

[00558] A16. Sistema de A1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (5), e no qual a dita saída comum compreende uma indicação de um limite de decisão usado por cada unidade para discriminação entre partículas.

[00559] A17. Sistema de A1, no qual cada das ditas unidades de citometria de fluxo compreende um sistema de separação de gotícula.

[00560] A18. Sistema de A1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (5), e no qual a dita saída do sistema compreende uma indicação de uma localização de ruptura de gotícula de cada unidade.

[00561] A19. Sistema de A1, no qual pelo menos uma das ditas unidades de citometria de fluxo compreende um sistema de fotodeterioração.

[00562] A20. Sistema de A1, no qual pelo menos uma das ditas unidades de citometria de fluxo compreende um sistema de separação de ligação de fluido.

[00563] A21. Sistema de A1, no qual as ditas unidades de citometria de fluxo são adaptadas para operarem em paralelo.

[00564] A22. Sistema de A1, no qual a plataforma integrada compreende pelo menos um laser compartilhado operável para emitir uma pluralidade de pulsos de radiação eletromagnética, no qual cada pulso apresenta uma potência de pico que excede a potência média do laser, e no qual uma ou mais das ditas unidades de citometria de fluxo compreendem:

[00565] um canal de fluxo para direcionar um fluxo de fluido contendo partículas de amostra através de uma localização de interrogação de partícula;

[00566] um sistema de orientação de feixe operável para direcionar uma porção da radiação eletromagnética em um pulso para a localização de interrogação;

[00567] um circuito de sincronização operável para produzir um sinal de sincronização indicativo da chegada da radiação eletromagnética na localização de interrogação;

[00568] um detector adaptado para detectar a radiação eletromagnética proveniente da localização de interrogação e operável para emitir um sinal analógico de variação de tempo indicativo da intensidade da radiação eletromagnética detectada;

[00569] um conversor do analógico para o digital adaptado para receber o sinal analógico de variação de tempo como entrada e para amostrar o sinal analógico para produzir uma saída digitalizada; e

[00570] um processador eletrônico operável para analisar a saída digitalizada originária do conversor do analógico para o digital como uma função do sinal de sincronização.

[00571] A23. Sistema de A1, no qual as múltiplas unidades de citometria de fluxo compreendem três ou mais unidades de citometria de fluxo.

[00572] A24. Sistema de A1, no qual as múltiplas unidades de citometria de fluxo compreendem pelo menos doze unidades de citometria de fluxo.

[00573] A25. Sistema, de acordo com a reivindicação A1, no qual a plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (5), e no qual o processador comum executa pelo menos uma das seguintes ações: (1) o recebimento e o processamento da dita informação em tempo real; e (2) o recebimento e o processamento da dita informação para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade.

[00574] A26. Sistema de A1, no qual cada unidade de citometria de

fluxo compreende um sensor operável para gerar um sinal de saída de variação de tempo indicativo de pelo menos uma característica das partículas, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (5) e a dita informação recebida pelo processador comum compreende os sinais de saída originários dos respectivos sensores, e no qual o processador é operável para receber os sinais de saída como um fluxo substancialmente contínuo e para substancialmente processar de forma contínua os sinais de saída em tempo real.

[00575] A27. Sistema de A1, no qual a dita plataforma integrada compreende um processador comum operável para enviar sinais de controle para as unidades de citometria de fluxo em tempo real durante um processo de separação para ajustar sua operação como uma função da dita informação recebida pelo processador comum, e no qual as unidades de citometria de fluxo são responsivas aos sinais de controle.

B. Método de Separação de Múltiplos Canais

[00576] B1. Método de múltiplos canais para separar partículas, de acordo com uma ou mais características das partículas, o dito método compreendendo:

[00577] a provisão de uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo;

[00578] a operação das ditas unidades de citometria de fluxo para conduzir uma pluralidade de operações de citometria de fluxo, as ditas operações compreendendo a formação de fluxos de fluido separados, cada qual contendo uma mistura de partículas, e a separação de populações desejadas de partículas nas ditas misturas de partículas por meio da interrogação dos fluxos com o uso de feixes de radiação eletromagnética; e

[00579] o compartilhamento de pelo menos um dos seguintes ele-

mentos enquanto da condução das ditas operações: (1) um suprimento comum de partículas para os ditos fluxos; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética para os ditos feixes; (3) uma entrada comum de controle de operações; (4) um processador comum para receber e processar a informação originária das unidades; (5) um sistema comum para dispensar fluido nos ditos fluxos; e (6) um alojamento comum para as ditas unidades de citometria de fluxo.

[00580] B2. Método de B1, no qual as ditas partículas são células.

[00581] B3. Método de B1, no qual as ditas partículas são células de esperma.

[00582] B4. Método de B1, no qual pelo menos uma das ditas múltiplas unidades de citometria de fluxo compreende uma unidade de citometria de fluxo de separação de gotícula no ar.

[00583] B5. Método de B1, que adicionalmente compreende pelo menos o compartilhamento da dita fonte comum de radiação eletromagnética na forma de um único feixe de laser, o dito método adicionalmente compreendendo a divisão do único feixe de laser em múltiplos feixes e o direcionamento dos múltiplos feixes para sistemas ópticos das respectivas unidades de citometria de fluxo.

[00584] B6. Método de B5, que adicionalmente compreende a reflexão de uma porcentagem de um feixe de luz do único feixe na direção do sistema óptico de uma das ditas unidades de citometria de fluxo, e a passagem de uma porcentagem de luz de feixe do único feixe para transmissão para o sistema óptico de outra das ditas unidades de citometria de fluxo.

[00585] B7. Método de B6, que adicionalmente compreende o uso de um laser de estado sólido para formar o dito único feixe de laser.

[00586] B8. Método de B7, que adicionalmente compreende o travamento de modo do laser de estado sólido, de modo que o único feixe de laser compreenda uma pluralidade de pulsos, onde cada pulso

apresenta uma potência de pico que é maior que a saída de potência média do laser.

[00587] B9. Método de B1, que adicionalmente compreende o compartilhamento de pelo menos um elemento (6), e no qual o dito método adicionalmente compreende a montagem removível das ditas unidades de citometria de fluxo no alojamento comum.

[00588] B10. Método de B1, que adicionalmente compreende pelo menos o compartilhamento da dita fonte comum de radiação eletromagnética na forma de um laser compartilhado, o método adicionalmente compreendendo as etapas de:

[00589] emitir uma pluralidade de pulsos de radiação eletromagnética (EMR) originários de um laser, onde a potência de pico de cada pulso excede a potência média do laser;

[00590] direcionar cada pulso em um sistema de divisão e de orientação de feixe para intermitentemente iluminar cada fluxo de fluido e as partículas contidas no mesmo por meio do direcionamento de uma porção da energia nos pulsos ao longo de um percurso de feixe do laser para cada localização de interrogação;

[00591] detectar a EMR originária de pelo menos uma localização de interrogação;

[00592] gerar um sinal analógico de variação de tempo indicativo da intensidade da EMR detectada a partir da dita localização de interrogação;

[00593] gerar um sinal de sincronização indicativo da chegada de um pulso na dita localização de interrogação;

[00594] converter o sinal analógico de variação de tempo em um sinal digital; e

[00595] analisar o sinal digital para determinar as características das partículas no fluxo de fluido que flui através da respectiva localização de interrogação.

[00596] B11. Método de B1, que adicionalmente compreende o uso de uma primeira estratégia de separação em uma primeira operação das ditas operações e uma segunda estratégia de separação diferente da primeira estratégia de separação em uma segunda operação das ditas operações.

[00597] B12. Método de B1, que adicionalmente compreende a coleta de uma população de partículas desejadas separada por cada unidade de citometria de fluxo, e a combinação da população coletada de uma unidade com uma população coletada originária de uma unidade diferente para produzir uma população misturada de partículas desejadas.

[00598] B13. Método de B1, que adicionalmente compreende a variação da taxa na qual o fluido é dispensado em uma ou mais unidades de citometria de fluxo como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de uma primeira população separada; e (2) a quantidade de partículas desejadas em uma segunda população.

[00599] B14. Método de B1, que adicionalmente compreende a condução das ditas operações de citometria de fluxo em paralelo.

[00600] B15. Método de B1, no qual a dita etapa de compartilhamento compreende o compartilhamento de pelo menos um elemento (4), o método adicionalmente compreendendo o uso do processador comum para executar pelo menos uma das seguintes ações: (1) receber e processar a dita informação em tempo real: (2) receber e processar a dita informação para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade.

[00601] B16. Método de B1, no qual a etapa de compartilhamento compreende o compartilhamento de pelo menos um elemento (4), o método adicionalmente compreendendo o uso de um sensor para cada respectiva unidade de citometria para gerar um sinal de saída de variação de tempo indicativo de pelo menos uma característica das

partículas e o uso do processador comum para receber os respectivos sinais de saída como um fluxo substancialmente contínuo e para processar os sinais de saída em tempo real.

[00602] B17. Método de B1, no qual a etapa de compartilhamento compreende o compartilhamento de pelo menos um elemento (4), o método adicionalmente compreendendo o envio de um sinal de controle para uma ou mais das unidades de citometria de fluxo em tempo real durante um processo de separação para ajustar a operação da unidade como uma função da informação recebida pelo processador comum.

C. [Reservada]

D. Analisador de Múltiplos Canais

[00603] D1. Sistema de múltiplos canais para classificar partículas de acordo com uma ou mais das características das partículas, o dito sistema compreendendo:

[00604] uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo, cada uma das quais sendo operável para classificar partículas em uma mistura de partículas por meio da interrogação de fluido contendo as ditas partículas com o uso de um feixe de radiação eletromagnética,

[00605] as ditas unidades compartilhando de uma plataforma integrada que compreende pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de partículas; (2) um alojamento comum; (3) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (4) um processador comum para receber e processar a informação originária das unidades; e (5) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar o fluido contendo as ditas partículas nas ditas unidades de citometria de fluxo.

[00606] D2. Sistema de D1, no qual a dita plataforma integrada adicionalmente compreende uma fonte comum de radiação eletromagnética.

- [00607] D3. Sistema de D1, no qual as ditas partículas são células.
- [00608] D4. Sistema de D1, no qual as ditas partículas são células de espermatozoides.
- [00609] D5. Sistema de D1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos os elementos (3) e (4).
- [00610] D6. Sistema de D5, no qual a dita plataforma integrada compreende uma fonte comum de radiação eletromagnética.
- [00611] D7. Sistema de D1, no qual a dita plataforma integrada adicionalmente compreende uma fonte comum de radiação eletromagnética, a dita fonte comum compreendendo um único feixe de laser.
- [00612] D8. Sistema D7, que adicionalmente compreende um sistema de divisão de feixe para dividir o único feixe de laser em múltiplos feixes e direcionar os múltiplos feixes em sistemas ópticos das respectivas unidades de citometria de fluxo.
- [00613] D9. Sistema de D1, no qual a dita plataforma compreende pelo menos um elemento (2), as ditas unidades de citometria de fluxo compreendendo módulos intercambiáveis montados no alojamento.
- [00614] D10. Sistema de D1, no qual cada unidade de citometria de fluxo compreende um sistema óptico de epi-iluminação para interrogar um respectivo fluxo de fluido.
- [00615] D11. Sistema de D1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (4), e no qual o dito processador é operável para emitir uma indicação da intensidade de fluorescência medida por cada unidade.
- [00616] D12. Sistema de D1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (4), e no qual o dito processador é operável para emitir uma indicação da taxa na qual cada unidade está separando partículas.
- [00617] D13. Sistema de D1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (4), e no qual o dito processador

dor é operável para emitir uma indicação das variações de tingimento de partículas.

[00618] D14. Sistema de D1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (4), e no qual o dito processador é operável para emitir uma indicação de um limite de decisão usado por cada unidade para discriminação entre partículas.

[00619] D15. Sistema de D1, no qual as ditas unidades de citometria de fluxo são adaptadas para operarem em paralelo.

[00620] D16. Sistema de D1, no qual a dita pluralidade de unidades de citometria de fluxo é operável para separar as partículas.

[00621] D17. Sistema de D16, no qual a plataforma integrada adicionalmente compreende uma fonte comum de radiação eletromagnética, e no qual a dita pluralidade de unidades de citometria de fluxo compreende uma unidade de citometria de fluxo de separação de gotícula de jato no ar.

[00622] D18. Sistema de D1, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (4), e no qual o processador comum é operável para executar pelo menos uma das seguintes ações: (1) receber e processar a dita informação em tempo real; e (2) receber e processar a dita informação para permitir a avaliação de uma unidade com relação à outra unidade.

[00623] D19. Sistema, de acordo com a reivindicação D1, no qual cada unidade de citometria de fluxo compreende um sensor operável para gerar um sinal de saída de variação de tempo indicativo de pelo menos uma característica das partículas, no qual a dita plataforma integrada compreende pelo menos um elemento (4) e a dita informação recebida pelo processador comum compreende a saída de sinais originários dos respectivos sensores, e no qual o processador é operável para receber os sinais de saída como um fluxo substancialmente contínuo e para processar os sinais de saída em tempo real.

[00624] D20. Sistema de D1, no qual a dita plataforma integrada compreende um processador comum operável para enviar sinais de controle para as unidades de citometria de fluxo em tempo real durante um processo de separação para ajustar sua operação como uma função da dita informação recebida pelo processador comum, e no qual as unidades de citometria de fluxo são responsivas aos sinais de controle.

E. Método de Análise de Múltiplos Canais

[00625] E1. Método de múltiplos canais de classificar partículas de acordo com uma ou mais características das partículas, o dito método compreendendo:

[00626] a provisão de uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo;

[00627] a operação das ditas unidades de citometria de fluxo para conduzir uma pluralidade de operações de citometria de fluxo, as ditas operações compreendendo a formação de fluxos de fluido separados, cada qual contendo uma mistura de partículas, e a classificação de partículas nas ditas misturas de partículas por meio da interrogação dos fluxos com o uso de feixes de radiação eletromagnética; e

[00628] o compartilhamento de pelo menos um dos elementos para conduzir as ditas operações: (1) um suprimento comum de partículas para os ditos fluxos; (2) uma entrada comum de controle de operações; (3) um processador comum para receber e processar a informação originária das unidades; (4) um sistema comum para dispensar fluido nos ditos fluxos; e (5) um alojamento comum para as ditas unidades de citometria de fluxo.

[00629] E2. Método de E1, que adicionalmente compreende o compartilhamento de uma fonte comum de radiação eletromagnética para os ditos feixes.

[00630] E3. Método de E2, no qual a dita pluralidade de unidades

de citometria de fluxo compreende uma unidade de citometria de fluxo de separação de gotículas de jato de ar.

[00631] E4. Método de E1, que adicionalmente compreende a operação da dita pluralidade de citômetros de fluxos para separar a dita mistura de partículas com base em sua classificação.

[00632] E5. Método de E1, no qual as ditas partículas são células.

[00633] E6. Método de E1, no qual as ditas partículas são células de esperma.

[00634] E7. Método de E1, que adicionalmente compreende o compartilhamento de uma fonte comum de radiação eletromagnética para os ditos feixes na forma de um único feixe de laser, a divisão do único feixe de laser em múltiplos feixes, e o direcionamento dos múltiplos feixes nos sistemas ópticos das respectivas unidades de citometria de fluxo.

[00635] E8. Método de E7, no qual a etapa de compartilhamento compreende pelo menos o elemento (5), o processo adicionalmente compreendendo a orientação do dito único feixe de laser no dito alojamento comum antes da divisão do feixe.

[00636] E9. Método de E7, que adicionalmente compreende a reflexão de uma porcentagem de feixe de luz do único feixe na direção do sistema óptico de uma das ditas unidades de citometria de fluxo, e a passagem de uma porcentagem de feixe de laser do único feixe para transmissão para o sistema óptico de outra das ditas unidades de citometria de fluxo.

[00637] E10. Método de E1, no qual a etapa de compartilhamento compreende pelo menos o elemento (5), o método adicionalmente compreendendo a montagem removível das ditas unidades de citometria de fluxo no alojamento comum.

[00638] E11. Método de E1, que compreende a operação de cada unidade de citometria de fluxo para interrogar um respectivo fluxo de

fluido com o uso de um sistema óptico de epi-iluminação.

[00639] E12. Método de E1, que adicionalmente compreende a operação das ditas unidades de citometria de fluxo em paralelo.

[00640] E13. Método de E1, no qual a dita pluralidade de unidades de citometria de fluxo compreende doze ou mais unidades de citometria de fluxo.

[00641] E14. Método de E1, no qual a etapa de compartilhamento compreende o compartilhamento de pelo menos um elemento (4), o método adicionalmente compreendendo o uso do processador comum para executar pelo menos uma das seguintes ações: (1) receber e processar a dita informação em tempo real; (2) receber e processar a dita informação para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade.

[00642] E15. Método de E1, no qual a etapa de compartilhamento compreende o compartilhamento de pelo menos um elemento (4), o método adicionalmente compreendendo o uso de um sensor para cada respectiva unidade de citometria para gerar um sinal indicativo de variação de tempo indicativo de pelo menos uma característica das partículas e o uso do processador comum para receber os respectivos sinais de saída como um fluxo substancialmente contínuo e para processar os sinais de saída em tempo real.

[00643] E16. Método de E1, no qual a etapa de compartilhamento compreende o compartilhamento de pelo menos um elemento (4), o método adicionalmente compreendendo o envio de um sinal de controle para uma ou mais das unidades de citometria de fluxo em tempo real durante um processo de separação para ajustar a operação da unidade como uma função da informação recebida pelo processador comum.

F. [Reservada]

G. Processo de Dividir Único Laser para Citometria de Múltiplos

Canais

[00644] G1. Método de separar partículas com o uso de um sistema compreendendo três ou mais unidades de citometria de fluxo, cada uma das quais sendo operável para separar uma população desejada de partículas originária de uma mistura de partículas por meio da inter-rogação de um fluxo de fluido contendo as ditas partículas com o uso de um feixe de luz, o dito método compreendendo:

[00645] a geração de um único feixe de laser;

[00646] a divisão do único feixe de laser em três ou mais feixes de luz e o direcionamento dos feixes de luz para os sistemas ópticos das unidades de citometria de fluxo; e

[00647] a operação das unidades de citometria de fluxo para separar as partículas.

[00648] G2. Método de G1, no qual cada unidade de citometria interroga o fluxo de fluido com um feixe de luz de aproximadamente a mesma intensidade.

[00649] G3. Método de G1, no qual cada unidade exige um feixe de luz apresentando uma potência de W watts, e onde o dito método adicionalmente compreende a geração do dito único feixe de laser apresentando uma potência de $(W \times N) + L$, onde N é igual ao número de unidades de citometria de fluxo e L é igual à perda de potência no sistema.

[00650] G4. Método de G1, que adicionalmente compreende o equilíbrio da quantidade de luz de feixe usada pelas unidades de citometria para interrogar os respectivos fluxos de fluido com o uso de um ou mais filtros para atenuar a intensidade de pelo menos um dos ditos três ou mais feixes de luz.

[00651] G5. Método de G4, que adicionalmente compreende o ajuste da intensidade da luz de feixe que entra nas respectivas unidades, de modo que cada unidade receba a mesma quantidade de luz de fei-

xe dentro de uma tolerância de 10%.

[00652] G6. Método de G1, no qual pelo menos uma das ditas unidades de citometria de fluxo usa um processo de separação de gotículas para separar as ditas partículas.

[00653] G7. Método de G1, no qual pelo menos uma das ditas unidades de citometria de fluxo usa um processo de fotodeterioração para separar as ditas partículas.

[00654] G8. Método de G1, no qual pelo menos uma das ditas unidades de citometria de fluxo usa um processo de separação por ligação de fluido para separar as ditas partículas.

[00655] G9. Método de G1, no qual as ditas unidades de citometria de fluxo são montadas em um alojamento comum, o método adicionalmente compreendendo a orientação do dito único feixe de laser no dito alojamento comum antes da divisão do feixe.

[00656] G10. Método de G9, que adicionalmente compreende a reflexão de uma porcentagem de luz de feixe do único feixe de laser na direção do sistema óptico de uma das ditas unidades de citometria de fluxo e a passagem de uma porcentagem da luz de feixe do único feixe de laser para transmissão para o sistema óptico de outra das ditas unidades de citometria de fluxo.

[00657] G11. Método de G1, no qual a etapa de dividir um único feixe compreende a divisão de um único feixe em quatro feixes separados.

[00658] G12. Método de G11, no qual a etapa de divisão compreende o uso de um divisor de feixe de 50/50 para dividir o único feixe em dois feixes, o uso de um segundo divisor de feixe de 50/50 para dividir um dos dois feixes em dois feixes adicionais, e o uso de um terceiro divisor de feixe de 50/50 para dividir o outro dos dois feixes em mais dois feixes adicionais.

H. Aparelho para Separação Usando a Estratégia de Separação

[00659] H1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação para separar as partículas de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de separação para prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[00660] um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de separação para variar sua estratégia de separação ou para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma população com relação às partículas de característica A ou às partículas de característica B; (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00661] H2. Sistema de H1, no qual as partículas são células, e as características A e B se referem às características físicas das células.

[00662] H3. Sistema de H1, no qual as partículas são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00663] H4. Sistema de H3, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$).

[00664] H5. Sistema de H4, que adicionalmente mantém a pureza de pelo menos uma dita população em mais de 85%, mas em menos

de 95%.

[00665] H6. Sistema de H1, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a dita pureza for maior que uma pureza desejada, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a dita pureza for menor do que a dita pureza desejada.

[00666] H7. Sistema de H1, no qual o controle determina a pureza de pelo menos uma dita população com base nos sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma pureza desejada, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido, de modo que a pureza corresponda à pureza desejada.

[00667] H8. Sistema de H7, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população for maior do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma população, e no qual o controle diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população for menor do que a dita quantidade aceitável.

[00668] H9. Sistema de H8, no qual o controle determina a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população com base nos sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma dita população, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido para obter a dita quantidade aceitável em pelo menos uma dita população.

[00669] H10. Sistema de H1, no qual o dito fluxo é formado para conter partículas que seguem geralmente umas depois das outras em

uma série que compreende os conjuntos seqüenciais de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas compreendendo uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundos conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando característica B, e terceiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresentando a característica A e pelo menos uma das quais apresentando a característica B.

[00670] H11. Sistema de H10, no qual o dito sistema de separação é operável para usar uma estratégia de separação na qual os ditos primeiros conjuntos de partículas são selecionados para coleta em pelo menos uma dita população e os ditos segundo e terceiros conjuntos não são selecionados para coleta em uma dita população.

[00671] H12. Sistema de H10, no qual o dito sistema de separação é operável para usar uma estratégia de separação na qual os ditos primeiros e terceiros conjuntos de partículas são selecionados para coleta em pelo menos uma dita população e os ditos segundos conjuntos de partículas não são selecionados para coleta em pelo menos uma dita população.

[00672] H13. Sistema de H1, no qual o dito sistema de separação compreende um sistema de separação de gotículas.

[00673] H14. Sistema de H1, no qual o dito sistema de separação compreende um sistema de separação por fotodeterioração.

[00674] H15. Sistema de H1, no qual o dito sistema de separação compreende um sistema de separação por ligação de fluido.

I. Método para Separar Partículas Usando a Estratégia de Separação

[00675] I1. Método de usar um sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o

dito método compreendendo:

[00676] a distribuição de um fluido contendo as ditas partículas;

[00677] a formação do fluido em um fluxo e o uso da citometria de fluxo para classificar as partículas no fluxo de acordo com as ditas características;

[00678] a separação das partículas no fluxo de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de separação para assim prover pelo menos uma população contendo as partículas desejadas; e

[00679] a variação da estratégia de separação ou a variação da taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00680] 12. Método de I1, no qual as partículas são células e as características A e B se referem às características físicas das células.

[00681] 13. Método de I1, no qual as ditas partículas são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00682] 14. Método de I3, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$).

[00683] 15. Método de I3, que adicionalmente mantém a dita pureza em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00684] 16. Método de I1, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a dita pureza for maior que uma pureza desejada, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a dita pureza for menor do que a pureza desejada.

[00685] 17. Método de I1, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma população for maior que uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma população, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população for menor que a dita quantidade aceitável.

[00686] 18. Método de I1, que adicionalmente compreende a formação do fluxo para conter partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos seqüenciais de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundos conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresentando a característica A e pelo menos uma das quais apresentando a característica B.

[00687] 19. Método de I8, que adicionalmente compreende a separação das ditas gotículas, de acordo com uma estratégia de separação, na qual apenas os primeiros conjuntos de partículas são selecionados para coleta em pelo menos uma dita população.

[00688] 110. Método de 18, que adicionalmente compreende a separação das ditas partículas de acordo com uma estratégia de separação, onde os primeiros e terceiros conjuntos de partículas são selecionados para coleta em pelo menos uma dita população.

[00689] 111. Método de I1, no qual a dita separação compreende o uso de um processo de separação de gotículas.

[00690] 112. Método de I1, no qual a dita separação compreende um processo de separação por fotodeterioração.

[00691] I13. Método de I1, no qual a dita separação compreende o uso de um processo de separação por ligação de fluido.

J. Separador de Gotículas Incluindo a Estratégia de Separação

[00692] J1. Sistema para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo:

[00693] um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluxo de fluido contendo as ditas partículas;

[00694] um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluxo, formar gotículas contendo as ditas partículas, e separar as ditas gotículas em diferentes populações de acordo com uma estratégia de separação, as ditas gotículas incluindo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundas partículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A e uma ou mais partículas apresentando a característica B; e

[00695] um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o aparelho de citometria de fluxo para variar a estratégia de separação e para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma população de gotículas com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou partículas de característica B em pelo menos uma população de gotículas com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00696] J2. Sistema de J1, no qual o controle controla o sistema de distribuição de fluido para manter a taxa na qual o fluido é dispensado

como substancialmente constante, e no qual o controle varia a estratégia de separação.

[00697] J3. Sistema de J2, no qual o controle varia a estratégia de separação a fim de variar a porcentagem das terceiras gotículas em uma das populações de gotículas.

[00698] J4. Sistema de J1, no qual o controle controla o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função da pureza de pelo menos uma dita população de gotículas.

[00699] J5. Sistema de J4, no qual a dita pureza é pelo menos de 85% e não mais de 95%.

[00700] J6. Sistema de J1, no qual o controle controla o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função da quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A no dito fluxo.

[00701] J7. Sistema de J6, no qual a taxa na qual é dispensado o fluido é variada, de modo que a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma população de gotículas represente pelo menos aproximadamente 60% da quantidade total de partículas de característica A no dito fluxo.

[00702] J8. Sistema de J1, no qual as ditas partículas são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00703] J9. Sistema de J1, no qual a relação de partículas de característica A/partículas de característica B na dita mistura é uma relação conhecida, e no qual o dito controle é operável para classificar uma das partículas como apresentando a característica A ou a característica B e para variar a taxa de distribuição de fluido como uma função da relação de partículas classificadas com relação a essa relação.

[00704] J10. Sistema de J1, no qual o controle determina uma pureza das partículas separadas com base nos sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma pureza desejada, e no qual o controle varia a taxa, de modo que a pureza de pelo menos uma dita população geralmente corresponde à pureza desejada.

K. Método de Separação de Gotículas Incluindo Estratégia de Separação

[00705] K1. Método de separação de uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo:

[00706] a distribuição de um fluxo de fluido contendo as ditas partículas;

[00707] a formação de gotículas contendo as ditas partículas;

[00708] a separação das ditas gotículas em diferentes populações de acordo com uma estratégia de separação, as ditas gotículas incluindo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundas gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A e uma ou mais partículas apresentando a característica B; e

[00709] a variação da estratégia de separação ou a variação da taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma população de gotículas com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma população de gotículas com relação à quantidade total de partículas de

característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00710] K2. Método de K1, que adicionalmente compreende a manutenção da taxa na qual o fluido é dispensado como substancialmente constante, e a variação da estratégia de separação.

[00711] K3. Método de K2, que adicionalmente compreende a variação da estratégia de separação a fim de variar a porcentagem das terceiras gotículas em uma das populações de gotículas.

[00712] K4. Método de K1, que adicionalmente compreende a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função da pureza de pelo menos uma das populações de gotículas.

[00713] K5. Método de K4, que adicionalmente compreende a manutenção da dita pureza na faixa de 85% à 95%.

[00714] K6. Método de K1, que adicionalmente compreende a variação da taxa na qual o fluido é dispensado como uma função da quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população de gotículas com relação à quantidade total de partículas de característica A no dito fluxo.

[00715] K7. Método de K6, no qual a taxa na qual é dispensado o fluido é variada, de modo que a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população de gotículas representa pelo menos aproximadamente 60% da quantidade total de partículas de característica A no dito fluxo.

[00716] K8. Método de K1, no qual as partículas são células de espermatozoide, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de espermatozoide X viva.

[00717] K9. Método de K1, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa, quando a pureza de pelo menos uma dita população de gotículas for maior do que a pureza desejada, e diminuirá a taxa, quando a pureza de pelo menos uma dita população de gotículas for menor do que a pureza desejada.

L. Separador de Gotículas de Taxa de Fluxo Variável Apresentando Circuito de Realimentação

[00718] L1. Sistema para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo:

[00719] um sistema de distribuição de fluido de taxa variável para dispensar um fluxo de fluido contendo as ditas partículas;

[00720] um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluxo, formar gotículas contendo as ditas partículas, e separar as ditas gotículas em diferentes populações de acordo com uma estratégia de separação, as ditas gotículas incluindo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundas gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B e terceiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A ou uma ou mais partículas apresentando a característica B; e

[00721] um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado do sistema de distribuição de fluido como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma das populações de gotículas com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma população de gotículas com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00722] L2. Sistema de L1, no qual o controle controla o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função da pureza de pelo menos uma das populações de gotículas.

[00723] L3. Sistema de L2, no qual a pureza é pelo menos de cerca de 85% e não mais de 95%.

[00724] L4. Sistema de L1, no qual o controle controla o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função da quantidade ou porcentagem de partículas de característica A em pelo menos uma população de gotículas com relação à quantidade total de partículas de característica A no dito fluxo.

[00725] L5. Sistema de L4, no qual a taxa na qual é dispensado o fluido é variada, de modo que a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma das ditas populações de gotículas represente pelo menos aproximadamente 60% da quantidade total de partículas de característica A no dito fluxo.

[00726] L6. Sistema de L1, no qual as partículas são células, e no qual as características A e B se referem às características físicas das células.

[00727] L7. Sistema de L1, no qual as ditas células de esperma são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00728] L8. Sistema, de acordo com a reivindicação L7, no qual pelo menos algumas das gotículas em pelo menos uma dita população de gotículas contêm pelo menos uma célula X viva e pelo menos uma célula Y na mesma gotícula, e no qual a dita pureza de pelo menos uma dita população de gotículas é medida por $X/(X+Y)$.

[00729] L9. Sistema de L8, no qual o dito controle é operável para variar a taxa de distribuição de fluido para manter a dita pureza em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00730] L10. Sistema de L7, no qual a característica B é indicativa de células que não são células X vivas.

[00731] L11. Sistema de L7, no qual o dito controle é operável para variar a taxa de distribuição de fluido, de modo que a porcentagem de

células X vivas em pelo menos uma dita população de gotículas seja pelo menos 60% do número total de células X vivas nas ditas primeira, segunda e terceira pluralidades de gotículas.

[00732] L12. Sistema de L11, no qual a pureza de pelo menos uma dita população de gotículas é mantida em menos de 95%.

[00733] L13. Sistema de L1, no qual a relação de partículas de característica A/partículas de característica B na dita mistura é uma relação conhecida, e no qual o dito controle é operável para classificar algumas das partículas apresentando a característica A ou a característica B e para variar a taxa de distribuição de fluido como uma função da relação das partículas classificadas com relação à relação conhecida.

[00734] L14. Sistema de L1, no qual as partículas apresentando a característica A são células de esperma X vivas e as partículas apresentando a característica B são células de esperma que não são células de esperma X vivas, e no qual o dito controle é operável para variar a taxa de distribuição de fluido como uma função da relação de células de esperma classificadas em 50%.

[00735] L15. Sistema de L1, no qual o controle aumentará a taxa, quando a pureza de pelo menos uma dita população de gotículas for maior do que uma pureza desejada, e diminuirá a taxa, quando a pureza de pelo menos uma dita população for menor do que a pureza desejada.

[00736] L16. Sistema de L1, no qual o controle determina uma pureza das partículas separadas com base nos sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma pureza desejada, e no qual o controle varia a taxa, de modo que pureza de pelo menos uma dita população de gotículas geralmente corresponda à pureza desejada.

M. Método de Separação de Gotículas Usando Taxa de Fluxo Variável e Realimentação

[00737] M1. Método de separação de uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito método compreendendo:

[00738] a distribuição de um fluxo de fluido contendo as ditas partículas;

[00739] a formação de gotículas contendo as ditas partículas;

[00740] a separação das ditas gotículas em diferentes populações de acordo com a estratégia de separação, as ditas gotículas incluindo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundas gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A e partículas apresentando a característica B; e

[00741] a variação da taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma das populações de gotículas com relação às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma população de gotículas com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00742] M2. Método de M1, que adicionalmente varia a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função da pureza de pelo menos uma das populações de gotículas.

[00743] M3. Método de M2, no qual a dita pureza é pelo menos 85% e não mais do que 95%.

[00744] M4. Método de M1, que adicionalmente compreende a variação da taxa na qual o fluido é dispensado como uma função da quan-

tidade de partículas de característica A em pelo menos uma população de gotículas com relação à quantidade total de partículas de característica A no dito fluxo.

[00745] M5. Método de M4, que adicionalmente compreende a variação da taxa de distribuição de fluido, de modo que a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma das ditas populações de gotículas represente pelo menos aproximadamente 60% da quantidade total das partículas de característica A no dito fluxo.

[00746] M6. Método de M1, no qual as partículas são células, e no qual as características A e B se refere às características físicas das células.

[00747] M7. Método de M1, no qual as ditas células são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00748] M8. Método de M7, no qual pelo menos algumas das ditas gotículas em pelo menos uma das ditas populações de gotículas contêm uma célula X viva e pelo menos uma célula Y na mesma gotícula, e no qual a dita pureza de pelo menos uma dita população de gotículas é medida por $X/(X+Y)$.

[00749] M9. Método de M8, que adicionalmente compreende a variação da taxa de distribuição de fluido para manter a dita pureza em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00750] M10. Método de M7, no qual a característica B é indicativa de células que não são células X vivas.

[00751] M11. Método de M7, que adicionalmente compreende a variação da taxa de distribuição de fluido, de modo que a porcentagem de células X vivas em pelo menos uma dita população de gotículas seja pelo menos aproximadamente 60% do número total de células X vivas nas primeira, segunda e terceira pluralidades de gotículas.

[00752] M12. Método, de acordo com a reivindicação M11, que adi-

cionalmente compreende a manutenção da pureza de pelo menos uma dita população de gotículas em menos de 95%.

[00753] M13. Método de M1, no qual a relação de partículas de característica A/partículas de característica B na dita mistura é uma relação conhecida, e o dito método adicionalmente compreende a variação da taxa de distribuição de fluido como uma função da relação de partículas classificadas com relação à relação conhecida.

[00754] M14. Método de M1, no qual as partículas apresentando a característica A são células de esperma X vivas e as partículas apresentando a característica B não são células de esperma X vivas, o dito método adicionalmente compreendendo a variação da taxa de distribuição de fluido como uma função da relação de células de esperma classificadas em 50%.

[00755] M15. Método de M1, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa, quando a pureza de pelo menos uma dita população de gotículas for maior do que a pureza desejada, e diminuirá a taxa, quando a pureza de pelo menos uma dita população de gotículas for menor do que a pureza desejada.

N. Sistema de Separação de Espermas para Estratégia de Separação de Pureza Elevada

[00756] N1. Sistema para separar células de esperma X e Y, o dito sistema compreendendo:

[00757] um sistema de distribuição de fluido de taxa variável para dispensar um fluxo de fluido contendo células de esperma X e Y;

[00758] um aparelho de citometria de fluxo para (1) receber o dito fluxo e formar gotículas contendo as ditas partículas, as ditas gotículas compreendendo primeiras gotículas contendo, cada qual uma ou mais células de esperma X, segundas gotículas contendo, cada qual, ou mais células de esperma Y, e uma terceira pluralidade de gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma X e uma ou

mais células de esperma Y, (2) separar as ditas primeiras gotículas a partir das ditas segundas e terceiras gotículas, (3) coletar as ditas primeiras gotículas para prover pelo menos uma população de células de esperma X, e (4) identificar uma quantidade de células de esperma X em pelo menos uma população; e

[00759] um controle responsivo às instruções recebidas do aparelho de citometria de fluxo para variar a taxa na qual o fluido é dispensado no aparelho de citometria de fluxo como uma função da quantidade de células de esperma X em pelo menos uma dita população com relação ao número total de células X nas ditas primeiras, segundas e terceiras gotículas.

[00760] N2. Sistema de N1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo é operável para identificar o número de células X coletadas em pelo menos uma dita população, e no qual o controle varia a taxa na qual o fluido é dispensado no aparelho de citometria de fluxo para manter a quantidade de células X coletadas em pelo menos uma dita população em uma quantidade aceitável ou acima desta com relação ao número total de células de esperma X nas ditas primeiras, segundas e terceiras gotículas.

[00761] N3. Sistema de N2, no qual a dita quantidade aceitável é pelo menos 60% do dito número total de células X.

[00762] N4. Sistema de N3, no qual as ditas células X são células X vivas.

[00763] N5. Sistema de N2, no qual o controle é operável para aumentar a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de células X em pelo menos uma dita população estiver acima da dita quantidade aceitável, e para diminuir a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de células X em pelo menos uma dita população estiver abaixo da dita quantidade aceitável.

O. Método de Separação de Espermatozoides Incluindo Estratégia de Se-

paração de Pureza Elevada

[00764] O1. Método de separar células de esperma X e Y, o dito método compreendendo:

[00765] a distribuição de um fluxo de fluido contendo células de esperma X e Y em uma primeira localização e a ruptura do dito fluxo em gotículas em uma segunda localização, as ditas gotículas compreendendo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma X, segundas gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma Y, e uma terceira pluralidade de gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma X ou uma ou mais células de esperma Y;

[00766] a separação das ditas primeiras gotículas a partir das ditas segundas e terceiras gotículas;

[00767] a coleta das ditas primeiras gotículas para prover pelo menos uma população de células de esperma X;

[00768] a identificação de uma quantidade de células de esperma X coletadas em pelo menos uma dita população; e

[00769] a variação da taxa na qual o fluido é dispensado na dita primeira localização como uma função da quantidade de células de esperma X identificadas coletadas em pelo menos uma dita população com relação ao número total de células X nas primeiras, segundas e terceiras gotículas.

[00770] O2. Método de O1, que adicionalmente compreende a variação da taxa na qual o fluido é dispensado na dita primeira localização para manter a quantidade de células de esperma X coletadas em pelo menos uma população em uma quantidade aceitável ou acima desta com relação ao número total de células de esperma X nas ditas primeiras, segundas e terceiras gotículas.

[00771] O3. Método de O2, no qual a dita quantidade aceitável é pelo menos 60% do dito número total de células X.

[00772] O4. Método de O3, no qual as ditas células X são células X vivas.

[00773] O5. Método de O1, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a porcentagem de células X coletadas em pelo menos uma dita população estiver acima da dita quantidade aceitável, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade ou porcentagem de células X coletadas em pelo menos uma dita população estiver abaixo da dita quantidade aceitável.

P. Separador de Espermas para Estratégia de Separação de Alta Recuperação

[00774] P1. Sistema para separar células de esperma X e Y, o dito sistema compreendendo:

[00775] um sistema de distribuição de fluido de taxa variável para dispensar um fluxo de fluido contendo células de esperma X e Y;

[00776] um aparelho de citometria de fluxo para (1) receber o dito fluxo e formar gotículas contendo as ditas partículas, as ditas gotículas compreendendo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma X, segundas gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma Y, e uma terceira pluralidade de gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma X ou uma ou mais células de esperma Y, (2) separar as ditas primeiras e terceiras gotículas das ditas segundas gotículas, (3) coletar as ditas primeiras e terceiras gotículas para prover pelo menos uma população de células de esperma X, e (4) identificar uma quantidade de células de esperma Y em pelo menos uma população; e

[00777] um controle responsivo às instruções recebidas do aparelho de citometria de fluxo para variar a taxa na qual o fluido é dispensado no aparelho de citometria de fluxo como uma função da quantidade de células de esperma X identificadas em pelo menos uma dita popula-

ção.

[00778] P2. Sistema de P1, no qual o dito controle varia a taxa na qual o fluido é dispensado para o sistema de citometria de fluxo para manter a pureza de pelo menos uma dita população em uma pureza desejada ou acima desta.

[00779] P3. Sistema de P2, no qual o dito controle é operável para aumentar a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza de pelo menos uma dita população for maior do que a dita pureza desejada, e para diminuir a dita taxa de distribuição de fluido, quando a pureza for menor do que a dita pureza desejada.

[00780] P4. Sistema de P2, no qual a dita pureza desejada não é maior que 95%.

[00781] P5. Sistema de P2, no qual as ditas células de esperma X são células vivas.

Q. Método de Separação de Espermatozoides Incluindo Estratégia de Separação de Alta Recuperação

[00782] Q1. Método de separar células de esperma X e Y, o dito método compreendendo:

[00783] a distribuição de um fluxo de fluido contendo células de esperma X e Y em uma primeira localização e a ruptura do dito fluxo em gotículas em uma segunda localização, as ditas gotículas compreendendo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma X, segundas gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma Y, e uma terceira pluralidade de gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma X ou uma ou mais células de esperma Y;

[00784] a separação das ditas primeiras e terceiras gotículas a partir das segundas gotículas;

[00785] a coleta das primeiras e terceiras gotículas para prover pelo menos uma população de células de esperma;

[00786] a identificação de uma quantidade de células de esperma Y coletadas em pelo menos uma dita população; e

[00787] a variação da taxa na qual o fluido é dispensado na dita primeira localização como uma função da quantidade de células de esperma Y coletadas em pelo menos uma dita população.

[00788] Q2. Método de Q1, que adicionalmente compreende a variação da taxa na qual o fluido é dispensado para manter a pureza de pelo menos uma dita população com relação às células X em uma pureza desejada ou acima desta.

[00789] Q3. Método de Q2, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a pureza de pelo menos uma dita população for maior do que a dita pureza desejada, e o decréscimo da taxa de distribuição de fluido, quando a pureza for menor do que a dita pureza desejada.

[00790] Q4. Método de Q2, no qual a dita pureza desejada não é maior do que 95%.

[00791] Q5. Método de Q2, no qual as ditas células de esperma X são células vivas.

[00792] Q6. Método de separar células de esperma X e Y com o uso de citometria de fluxo, o dito método compreendendo:

[00793] a distribuição de um fluxo de fluido contendo células de esperma X e Y em uma primeira localização e a ruptura do fluxo em gotículas em uma segunda localização, as ditas gotículas compreendendo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma X, segundas gotículas contendo, cada qual uma ou mais células de esperma Y, e uma terceira pluralidade de gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma X ou uma ou mais células de esperma Y;

[00794] a separação das ditas primeiras e terceiras gotículas das segundas gotículas; e

[00795] a coleta das ditas primeiras e terceiras gotículas para prover pelo menos uma população de células de esperma X.

[00796] Q7. Método de Q6, no qual as ditas células de esperma X são células vivas e não células X mortas.

[00797] Q8. Método de separação de células de esperma X e Y com o uso de citometria de fluxo, o dito método compreendendo:

[00798] a distribuição de um fluxo de fluido contendo células de esperma X e Y e a ruptura do dito fluxo em gotículas;

[00799] a interrogação do fluxo de fluido antes que ele se rompa em gotículas para identificar quais células de esperma ficarão em quais gotículas;

[00800] a separação de gotículas contendo células de esperma X e de gotículas não contendo células de esperma X; e

[00801] a coleta das ditas gotículas contendo células de esperma X, incluindo gotículas contendo pelo menos uma célula de esperma X e pelo menos uma célula de esperma Y.

[00802] Q9. Método de Q8, no qual as ditas células de esperma X são células X vis e não células X mortas.

R. Separação por Fotodeterioração Apresentando Estratégia de Separação

[00803] R1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação que compreende um laser para remover as partículas selecionadas no fluxo de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de separação para pro-

ver pelo menos uma população contendo as partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[00804] um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o laser para variar sua estratégia de separação ou para controlar a distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A não-removidas ou partículas de característica B não-removida em pelo menos uma população com relação à quantidade total das partículas de característica A ou partículas de característica B no dito fluxo.

[00805] R2. Sistema de R1, no qual as partículas são células, e no qual as características A e B se referem às características físicas das células.

[00806] R3. Sistema de R1, no qual as ditas células são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00807] R4. Sistema de R3, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$).

[00808] R5. Sistema de R1, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza de pelo menos uma dita população for maior do que uma pureza desejada, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza for menor do que a pureza desejada.

[00809] R6. Sistema de R1, no qual o controle determina a dita pureza com base em sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma pureza desejada, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido para obter a

pureza desejada.

[00810] R7. Sistema de R1, no qual o dito fluxo é formado em um fluxo contendo partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos seqüenciais de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando uma característica A, segundos conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiros jogos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresenta uma característica A e pelo menos uma das quais apresenta uma característica B.

[00811] R8. Sistema de R7, no qual o dito laser remove apenas os segundos conjuntos de partículas.

[00812] R9. Sistema de R8, no qual o dito controle mantém a pureza de pelo menos uma dita população em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00813] R10. Sistema de R7, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$) e o dito laser é operável para remover os segundos conjuntos de partículas e os terceiros conjuntos de partículas no fluxo.

[00814] R11. Sistema de R10, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população for maior do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma população, e no qual o controle diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população for menor do que a dita quantidade aceitável.

[00815] R12. Sistema de R10, no qual o controle determina a quan-

tidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população com base nos sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma quantidade aceitável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido para obter a quantidade aceitável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população.

S. Método de Separação por Fotodeterioração Incluindo Estratégia de Separação

[00816] S1. Método de usar um sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito método compreendendo:

[00817] a distribuição de um fluido contendo as ditas partículas;

[00818] a formação do fluido em um fluxo e o uso da citometria de fluxo para classificar as partículas no fluxo de acordo com as ditas características;

[00819] a separação das partículas no fluxo com a remoção de partículas selecionadas de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de separação para assim prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas; e

[00820] a variação da estratégia de separação ou a variação da taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A não-removidas ou partículas de característica B não-removidas em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de par-

tículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00821] S2. Método de S1, no qual as partículas são células, e no qual as características A e B se referem às características físicas das células.

[00822] S3. Método de S1, no qual as ditas células são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00823] S4. Método de S1, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a pureza de pelo menos uma dita população for maior do que uma pureza desejada, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza for menor do que a pureza desejada.

[00824] S5. Método de S1, que adicionalmente compreende a formação do dito fluido em um fluxo contendo partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos seqüenciais de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando uma característica A, segundos conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, partículas apresentando a característica B, e terceiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresentando um característica A e pelo menos uma das quais apresentando a característica B.

[00825] S6. Método de S5, que adicionalmente compreende a ablação dos segundos conjuntos de partículas e não dos primeiros e terceiros conjuntos de partículas.

[00826] S7. Método de S6, que adicionalmente compreende a manutenção da pureza de pelo menos uma dita população em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00827] S8. Método de S6, que adicionalmente compreende a ablação dos segundos e terceiros conjuntos de partículas e não dos primeiros conjuntos de partículas.

[00828] S9. Método de S8, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma população for maior do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma população, e o decréscimo da taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população for menor do que a dita quantidade aceitável.

T. Separador por Fotodeterioração Apresentando Taxa de Fluxo Variável e Realimentação

[00829] T1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo um sistema de distribuição de fluido de taxa variável para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação compreendendo um laser para remover as partículas selecionadas no fluxo de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de separação para prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[00830] um controle responsivo à informação recebido do aparelho de citometria de fluxo para controlar o laser para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de caracte-

rística B; e (2) a quantidade de partículas de característica A não-removidas ou de partículas de característica B não-removidas em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00831] T2. Sistema de T1, no qual as partículas são células e as características A e B se referem às características físicas das células.

[00832] T3. Sistema de T2, no qual as ditas células são células de esperma e a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00833] T4. Sistema de T3, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$) e o dito laser remove apenas os segundos conjuntos de partículas.

[00834] T5. Sistema de T4, que adicionalmente compreende a manutenção da pureza de pelo menos uma dita população em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00835] T6. Sistema de T2, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$), e no qual o dito laser remove os segundos e terceiros conjuntos de partículas.

[00836] T7. Sistema de T1, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza de pelo menos uma população for maior do que a pureza desejada, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza for menor do que a pureza desejada.

[00837] T8. Sistema de T1, no qual o controle determina uma pureza de pelo menos uma população com base em sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma pureza desejada, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido para obter a pureza desejada.

[00838] T9. Sistema de T8, no qual o controle aumentará a taxa de

distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população for maior que uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma dita população, e no qual o controle diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando as partículas de característica A em pelo menos uma população for menor do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma população.

[00839] T10. Sistema de T8, no qual o controle determina o número total de partículas de característica A em pelo menos uma dita população com base em sinais de saída originários do dito aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar a quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma população, e no qual o controle varia a taxa, de modo que a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma população obtenha a dita quantidade ou porcentagem aceitável.

[00840] T11. Sistema de T1, no qual o dito fluxo é formado em um fluxo contendo partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos seqüências de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas, cada qual compreendendo uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundos conjuntos compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresenta a característica A e pelo menos uma das quais apresenta a característica B.

[00841] T12. Sistema de T11, no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva (X), no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$), onde o laser remove os segundos conjuntos de partículas e os terceiros conjuntos de partículas e não

remove os primeiros conjuntos de partículas, e no qual o controle varia a taxa na qual o fluido é dispensado para o aparelho de citometria de fluxo como uma função do número de células de esperma X em pelo menos uma população.

[00842] T13. Sistema de T11, no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva (X), no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$), no qual o laser remove os segundos conjuntos de partículas e não os primeiros e terceiros conjuntos de partículas, e no qual o controle varia a taxa na qual o fluido é dispensado para o sistema de citometria de fluxo como uma função do número de células de esperma $\sim X$ em pelo menos uma dita população.

U. Método de Separação por Fotodeterioração Incluindo Estratégia de Separação de Taxa de Fluxo Variável

[00843] U1. Método de usar um sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito método compreendendo:

[00844] a distribuição de um fluido contendo as ditas partículas;

[00845] a formação do fluido em um fluxo e o uso da citometria de fluxo para classificar as partículas no fluxo de acordo com as ditas características;

[00846] a separação das partículas no fluxo com a ablação das partículas selecionadas de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de classificação para assim prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas; e

[00847] a variação da taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A não-removidas ou partículas de característica B

não-removidas em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00848] U2. Método de U1, no qual as partículas são células e as características A e B se referem às características físicas das células.

[00849] U3. Método de U2, no qual as ditas células são células de esperma e a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00850] U4. Método de U3, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$) e o dito laser remove apenas os segundos conjuntos de partículas.

[00851] U5. Método de U4, que adicionalmente compreende a manutenção da pureza de pelo menos uma dita população em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00852] U6. Método de U2, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$), e no qual o dito laser remove os segundos e terceiros conjuntos de partículas.

[00853] U7. Método de U1, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza de pelo menos uma população for maior do que a pureza desejada, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza for menor do que a pureza desejada.

[00854] U8. Sistema de U1, no qual o controle determina uma pureza de pelo menos uma população com base nos sinais de saída originais do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma pureza desejada, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido para obter a pureza desejada.

[00855] U9. Sistema de U8, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população for maior do que uma quan-

tidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma dita população, e no qual o controle diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma população for menor do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma população.

[00856] U10. Sistema de U8, no qual o controle determina o número total de partículas de característica A em pelo menos uma dita população com base nos sinais de saída do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma dita população, e no qual o controle varia a taxa, de modo que a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma população obtenha a dita quantidade ou porcentagem aceitável.

[00857] U11. Sistema de U1, no qual o dito fluxo é transformado em um fluxo contendo partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos seqüenciais de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundos conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresentando a característica A e pelo menos uma das quais apresentando a característica B.

[00858] U12. Sistema de U11, no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva (X), no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$), no qual o laser remove os segundos conjuntos de partículas e os terceiros conjuntos de partículas e não os primeiros conjuntos de partículas, e no qual o controle varia a taxa na

qual o fluido é dispensado para o aparelho de citometria de fluxo como uma função do número de células de esperma X em pelo menos uma população.

[00859] U13. Sistema de U11, no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva (X), no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva, no qual o laser remove os segundos conjuntos de partículas e não os primeiros e terceiros conjuntos de partículas, e no qual o controle varia a taxa na qual o fluido é dispensado para o sistema de citometria de fluxo como uma função do número de células de esperma $\sim X$ em pelo menos uma dita população.

V. Separador de Partículas de Ligação de Fluido Incluindo Estratégia de Separação

[00860] V1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo um sistema de distribuição de fluido para distribuição um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação de ligação de fluido para separar partículas selecionadas no fluxo de acordo com a dita classificação e de acordo com a estratégia de separação para prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[00861] um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de separação de ligação de fluido para variar sua estratégia de separação ou para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às

partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00862] V2. Sistema de V1, no qual as partículas são células, e no qual as características A e B se referem às características físicas das células.

[00863] V3. Sistema de V1, no qual as ditas células são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00864] V4. Sistema de V3, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$).

[00865] V5. Sistema de V1, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza de pelo menos uma dita população for maior do que uma pureza desejada, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza for menor do que a pureza desejada.

[00866] V6. Sistema de V1, no qual o controle determina a dita pureza com base em sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma pureza desejada, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido para obter a pureza desejada.

[00867] V7. Sistema de V1, no qual o dito fluxo é transformado em um fluxo contendo partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos seqüenciais de partículas, incluindo primeiros jogos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundos jogos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais

partículas apresentando a característica B, e terceiros jogos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresenta uma característica A e pelo menos uma das quais apresenta uma característica B.

[00868] V8. Sistema de V7, no qual o dito laser remove apenas os segundos conjuntos de partículas.

[00869] V9. Sistema de V8, no qual o dito controle mantém a pureza de pelo menos uma dita população em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00870] V10. Sistema de V7, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$) e o dito laser é operável para remover os segundos conjuntos de partículas e os terceiros conjuntos de partículas no fluxo.

[00871] V11. Sistema de V10, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população for maior do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma população, e no qual o controle diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população for menor do que a dita quantidade aceitável.

[00872] V12. Sistema de V10, no qual o controle determina a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma população com base nos sinais de saída do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma quantidade aceitável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido para obter a quantidade aceitável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população.

W. Método de Separação por Ligação de Fluido Incluindo Estratégia de Separação

[00873] W1. Método de usar um sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito método compreendendo:

[00874] a distribuição de um fluido contendo as ditas partículas;

[00875] a formação do fluido em um fluxo e o uso da citometria de fluxo pra classificar as partículas no fluxo de acordo com as ditas características;

[00876] a separação das partículas no fluxo com o desvio das partículas selecionadas no fluxo de acordo com a dita classificação e de acordo com a estratégia de separação para assim prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas; e

[00877] a variação da estratégia de separação ou a variação da taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00878] W2. Método de W1, no qual as partículas são células, e no qual as características A e B se referem às características físicas das células.

[00879] W3. Método de W1, no qual as ditas células são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00880] W4. Método de W1, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a pureza de pelo

menos uma dita população for maior do que uma pureza desejada, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza for menor do que a pureza desejada.

[00881] W5. Método de W1, que adicionalmente compreende a transformação do dito fluido em um fluxo contendo partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos seqüenciais de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundos conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresenta uma característica A e pelo menos uma das quais apresenta a característica B.

[00882] W6. Método de W5, que adicionalmente compreende a ablação dos segundos conjuntos de partículas e não dos primeiros e terceiros conjuntos de partículas.

[00883] W7. Método de W6, que adicionalmente compreende a manutenção da pureza de pelo menos uma dita população em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00884] W8. Método de W5, que adicionalmente compreende a ablação dos segundos e terceiros conjuntos e não dos primeiros conjuntos.

[00885] W9. Método de W8, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população for maior do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma população, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita po-

pulação for menor do que a dita quantidade aceitável.

X. Separador por Ligação de Fluido Incluindo Estratégia de Separação de Taxa de Fluxo Variável

[00886] X1. Sistema para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação de ligação de fluido para separar as partículas selecionadas no fluxo de acordo com a dita classificação para prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[00887] um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00888] X2. Sistema de X1, no qual as partículas são células, e no qual as características A e B se referem às características físicas das células.

[00889] X3. Sistema de X1, no qual as ditas células são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00890] X4. Sistema de X3, no qual a característica B é indicativa

de outra célula X viva ($\sim X$).

[00891] X5. Sistema de X1, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza de pelo menos uma população for maior do que a pureza desejada, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a pureza for menor do que a pureza desejada.

[00892] X6. Sistema de X1, no qual o controle determina a dita pureza com base nos sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma pureza desejada, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido para obter a pureza desejada.

[00893] X7. Sistema de X1, no qual o fluxo é transformado em um fluxo contendo partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos seqüenciais de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundos conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresenta a característica A e pelo menos uma das quais apresenta a característica B.

[00894] X8. Sistema de X7, no qual o dito laser remove apenas os segundos conjuntos de partículas.

[00895] X9. Sistema de X8, no qual o dito controle mantém a pureza de pelo menos uma dita população em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00896] X10. Sistema de X7, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$) e o dito laser é operável para remover os segundos conjuntos de partículas e os terceiros conjuntos de partículas no fluxo.

[00897] X11. Sistema de X10, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população for maior do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população, e no qual o controle diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população for menor do que a dita quantidade aceitável.

[00898] X12. Sistema de X10, no qual o controle determina a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população com base nos sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma quantidade aceitável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido para obter a quantidade desejável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população.

Y. Método de Separação por Ligação de Fluido Incluindo Taxa de Fluxo Variável e Realimentação

[00899] Y1. Método de usar um sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito método compreendendo:

[00900] a distribuição de um fluido contendo as ditas partículas;

[00901] a formação do fluido em um fluxo e o uso de citometria de fluxo para classificar as partículas no fluxo de acordo com as ditas características;

[00902] a separação das partículas no fluxo com o desvio das partículas selecionadas no fluxo de acordo com a dita classificação para

assim prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas; e

[00903] a variação da taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00904] Y2. Método de Y1, no qual as partículas são células, e no qual as características A e B se referem às características físicas das células.

[00905] Y3. Método de Y1, no qual as ditas células são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00906] Y4. Método de Y1, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a pureza de pelo menos uma dita população for maior do que uma pureza desejada, e o decréscimo da taxa de distribuição de fluido, quando a pureza for menor do que a pureza desejada.

[00907] Y5. Método de Y1, que adicionalmente compreende a formação do dito fluido em um fluxo contendo partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos seqüenciais de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundos conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiros conjuntos de partículas compreendendo duas ou mais partículas estritamente espaçadas entre si, pelo menos uma das quais apresenta a característica A e pelo menos uma das quais apresenta a

característica B.

[00908] Y6. Método de Y5, que adicionalmente compreende a ablação dos segundos conjuntos de partículas e não dos primeiros e terceiros conjuntos de partículas.

[00909] Y7. Método de Y6, que adicionalmente compreende a manutenção da pureza de pelo menos uma dita população em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00910] Y8. Método de Y5, que adicionalmente compreende os segundos e terceiros conjuntos de partículas e não os primeiros conjuntos de partículas.

[00911] Y9. Método de Y8, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população for maior do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma população, e o decréscimo da taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A não-removidas em pelo menos uma dita população for menor do que a dita quantidade aceitável.

Z. [Reservada]

AA. Conversor do Analógico para Sinais de Saída PMT e Análise e Classificação de DSP

[00912] AA1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação para separar as partículas de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de

separação para prover pelo menos uma população contendo as partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[00913] um conversor do analógico para o digital que sincronicamente mostra uma saída analógica de variação de tempo originária do dito aparelho de citometria de fluxo e supre uma saída incluindo informação digital correspondendo à dita saída analógica de variação de tempo, onde a dita saída analógica de variação de tempo e a informação digital correspondente são indicativas da característica A ou da característica B;

[00914] um processador de sinal digital que analisa e classifica a informação digital e supre um sinal de separação para o dito sistema de separação como uma função da informação digital analisada e classificada.

[00915] AA1A. Sistema de AA1, no qual a saída analógica de variação de tempo compreende uma série de pulsos de forma de onda, cada um dos quais sendo representativo de característica de uma partícula, no qual o processador de sinal digital detecta porções da informação digital correspondendo aos pulsos de forma de onda e classifica as ditas porções detectadas, e no qual o processador de sinal digital supre um sinal de separação como uma função das ditas porções detectadas e classificadas.

[00916] AA1B. Sistema de AA1, que adicionalmente compreende um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de separação para variar sua estratégia de separação ou para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos

uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00917] AA2. Sistema de AA1B, no qual as partículas são células e as características A e B se referem às características físicas das células.

[00918] AA3. Sistema de AA1B, no qual as partículas são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00919] AA4. Sistema de AA3, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$).

[00920] AA5. Sistema de AA4, que adicionalmente compreende a manutenção da pureza de pelo menos uma dita população em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00921] AA6. Sistema de AA1, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a dita pureza for maior do que uma pureza desejada, e diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a dita pureza for menor do que a dita pureza desejada.

[00922] AA7. Sistema de AA1, no qual o controle determina a pureza de pelo menos uma dita população com base nos sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma pureza desejada, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido, de modo que a pureza corresponda à pureza desejada.

[00923] AA8. Sistema de AA7, no qual o controle aumentará a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população for maior do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma população, e no qual o controle diminuirá a taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A em

pelo menos uma dita população for menor do que a dita quantidade aceitável.

[00924] AA9. Sistema de AA8, no qual o controle determina a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população com base em sinais de saída originários do aparelho de citometria de fluxo, o dito sistema adicionalmente compreendendo uma entrada de operador para o controle para indicar uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma dita população, e no qual o controle varia a taxa de distribuição de fluido para obter a dita quantidade desejada em pelo menos uma dita população.

[00925] AA10. Sistema de AA1, no qual o dito fluxo é formado para conter partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos seqüenciais de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundos conjuntos de partículas compreendendo, cada qual uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresenta a característica A e pelo menos uma das quais apresenta a característica B.

[00926] AA11. Sistema de AA10, no qual o dito sistema de separação é operável para usar uma estratégia de separação na qual os ditos primeiros conjuntos de partículas são selecionados para coleta em pelo menos uma dita população e os ditos segundos e terceiros conjuntos de partículas não são selecionados para coleta em pelo menos uma dita população.

[00927] AA12. Sistema de AA10, no qual o dito sistema de separação é operável para usar uma estratégia de separação na qual os ditos primeiros e terceiros conjuntos de partículas são selecionados para coleta em pelo menos uma dita população e o dito segundo conjunto

de partículas não é selecionado para coleta em pelo menos uma dita população.

[00928] AA13. Sistema de AA1, no qual o dito sistema de separação compreende um sistema de separação de gotículas.

[00929] AA14. Sistema de AA1, no qual o dito sistema de separação compreende um sistema de separação por fotodeterioração.

[00930] AA15. Sistema de AA1, no qual o dito sistema de separação compreende um sistema de separação de ligação de fluido.

[00931] AA16. Sistema de AA1, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para detectar pulsos que correspondem à informação digital, instruções para extrair características nos pulsos detectados, e instruções para discriminar os pulsos detectados como uma função de suas características extraídas.

[00932] AA17. Sistema de AA16, no qual o dito processador digital inclui instruções para definir um limite de decisão que discrimina entre as características extraídas representando a característica A e as características extraídas representando a característica B.

[00933] AA18. Sistema de AA17, no qual o dito processador de sinal ajusta a relativa localização do limite de decisão com relação às características extraídas que representam a característica A e com relação às características extraídas que representam a característica B como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00934] AA19. Sistema de AA1, no qual o dito processador de sinal digital compreende um processador de gerenciamento de dados para

reunir a informação digital em um fluxo contínuo.

[00935] AA20. Sistema de AA1, no qual o dito processador de sinal digital compreende um processador de detecção de pulso para detectar pulsos de forma de onda representados pela informação digital, e no qual o dito processador de sinal digital classifica a informação digital como uma função dos pulsos de forma de onda detectados.

[00936] AA21. Sistema de AA20, que adicionalmente compreende um filtro para filtrar a saída analógica em uma frequência igual ou menor que metade da taxa de amostragem contínua do conversor, no qual o conversor converte a saída analógica filtrada em informação digital correspondente, e no qual o dito processador de sinal digital classifica a informação digital como uma função de um limite de discriminação.

[00937] AA22. Sistema de AA21, no qual a taxa de amostragem contínua é de cerca de 105 MHz ou mais.

[00938] AA23. Sistema de AA1, no qual o dito processador de sinal digital compreende um processador de extração e discriminação de característica para definir um limite de decisão que discrimina entre as características extraídas que representam a característica A e as características extraídas que representam a característica B, e no qual o processador de extração e discriminação de características extrai características representadas pela dita informação digital e classifica as características como uma função do limite de decisão.

[00939] AA24. Sistema de AA1, no qual o dito processador de sinal digital compreende um processador de separação responsivo à classificação para prover os sinais de separação para o dito sistema de separação.

[00940] AA25. Sistema de AA1, no qual o processador enumera as partículas classificadas apresentando a característica A ou apresentando a característica B.

[00941] AA26. Sistema de AA1, no qual o dito processador de sinal digital classifica a informação digital como uma função de reduzir um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A como sendo igual ou menor que uma quantidade preestabelecida ou como uma função de minimizar o coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B como sendo substancialmente igual ou menor que uma quantidade preestabelecida.

[00942] AA27. Sistema de AA26, no qual a quantidade preestabelecida é de cerca de 1,5% ou menos.

[00943] AA27a. Sistema de AA26, no qual a quantidade preestabelecida é de cerca de 1,3% ou menos.

[00944] AA28. Sistema de AA1, no qual o dito processador de sinal digital classifica a informação digital, de tal modo que uma população das partículas apresentando a característica A e uma população das partículas apresentando a característica B corresponda a um modelo de computador de três populações incluindo uma primeira população de modelo de partículas apresentando a característica A, uma segunda população de modelo de partículas apresentando a característica B, e uma terceira população de modelo de partículas desalinhadas, o dito modelo estimando a estatística de população para cada uma das primeira, segundo e terceira populações de modelo.

[00945] AA29. Sistema de AA28, no qual a terceira população de modelo compreende duas populações de partículas desalinhadas, e no qual o modelo estima a estatística de população para as duas populações.

[00946] AA30. Sistema de AA1, no qual o dito processador digital compreende um processador de detecção de pulso para detectar pulsos de forma de onda representados pela informação digital, e no qual o dito processador de sinal digital classifica a informação digital como

uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A ou como uma função do coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B.

[00947] AA30a. Sistema de AA30, que adicionalmente compreende um filtro para filtrar a saída analógica em uma frequência igual ou menor que metade da taxa de amostragem contínua do conversor, no qual o conversor converte a saída analógica filtrada em informação digital correspondente, e no qual o dito processador de sinal digital classifica a informação digital como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A ou como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B.

[00948] AA30b. Sistema de AA1, no qual o dito processador de sinal digital compreende um processador de extração e discriminação de característica para definir um limite de decisão que discrimina entre as características extraídas que representam a característica A e características extraídas que representam a característica B, e no qual o processador de extração e discriminação de característica extrai características representadas pela dita informação digital e classifica as características como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A ou como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B.

[00949] AA31. Método de usar um sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito método compreendendo:

[00950] a distribuição de um fluido contendo as ditas partículas;

[00951] a formação do fluido em um fluxo e o uso da citometria de

fluxo para detectar as partículas no fluxo de acordo com as ditas características;

[00952] a separação das partículas no fluxo e de acordo com uma estratégia de separação para assim prover pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

[00953] a conversão de uma saída analógica originária da dita citometria de fluxo em informação digital correspondente, onde a saída analógica é indicativa de característica A ou de característica B; e

[00954] a análise e a classificação da informação digital e a separação das partículas como uma função da informação digital analisada e classificada.

[00955] AA31A. Método de AA31, que adicionalmente compreende a variação da estratégia de separação ou a variação da taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00956] AA32. Método de AA31, no qual as partículas são células, e as características A e B se referem às características físicas das células.

[00957] AA33. Método de AA31, no qual as partículas são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[00958] AA34. Método de AA33, no qual a característica B é indicativa de outra célula X viva ($\sim X$).

[00959] AA35. Método de AA33, que adicionalmente compreende a manutenção da dita pureza em mais de 85%, mas em menos de 95%.

[00960] AA36. Método de AA31, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a dita pureza for maior do que uma pureza desejada, e o decréscimo da taxa de distribuição de fluido, quando a dita pureza for menor do que a pureza desejada.

[00961] AA37. Método de AA31, que adicionalmente compreenderá o aumento da taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade de partículas de característica A em pelo menos uma dita população for maior do que uma quantidade aceitável de partículas de característica A em pelo menos uma população, e o decréscimo da taxa de distribuição de fluido, quando a quantidade partículas de característica A em pelo menos uma dita população for menor do que a dita quantidade aceitável.

[00962] AA38. Método de AA31, que adicionalmente compreende a formação do fluxo para conter partículas que seguem geralmente umas depois das outras em uma série que compreende conjuntos sequenciais de partículas, incluindo primeiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica A, segundos conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, uma ou mais partículas apresentando a característica B, e terceiros conjuntos de partículas compreendendo, cada qual, duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresenta a característica A e pelo menos uma das quais apresenta a característica B.

[00963] AA39. Método de AA38, que adicionalmente compreende a separação das ditas partículas de acordo com uma estratégia de separação na qual apenas os primeiros conjuntos de partículas são selecionados para coleta em pelo menos uma dita população.

[00964] AA40. Método de AA38, que adicionalmente compreende a separação das ditas partículas de acordo com uma estratégia de sepa-

ração na qual os primeiros e terceiros conjuntos de partículas são selecionados para a coleta em pelo menos uma dita população.

[00965] AA41. Método de AA31, no qual a dita separação compreende o uso de um processo de separação de gotículas.

[00966] AA42. Método de AA31, no qual a dita separação compreende o uso de um processo de separação por fotodeterioração.

[00967] AA43. Método de AA31, no qual a dita separação compreende o uso de um processo de separação por ligação de fluido.

[00968] AA44. Método de AA31, que adicionalmente compreende a detecção de pulsos de forma de onda representados pela informação digital, a extração de características dos pulsos de forma de onda a partir da informação digital, e a discriminação dos pulsos de forma de onda detectados como uma função de suas características extraídas.

[00969] AA45. Método de AA44, que adicionalmente compreende a definição de um limite de decisão que discrimina entre as características extraídas que representam a característica A e as características extraídas que representam a característica B.

[00970] AA46. Método de AA45, que adicionalmente compreende o ajuste da relativa localização do limite de decisão com relação às características extraídas que representam a característica A e com relação às características extraídas que representam a característica B como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00971] AA47. Método de AA31, no qual a dita conversão compreende a amostragem sincrônica da saída analógica.

[00972] AA48. Método de AA31, no qual a classificação da informação digital compreende a classificação da informação digital como uma função de minimizar um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A como sendo substancialmente igual ou menor que uma quantidade preestabelecida ou como uma função de minimizar um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B como sendo substancialmente igual ou menor que uma quantidade preestabelecida.

[00973] AA49. Método de AA48, no qual a quantidade preestabelecida é de cerca de 1,5% ou menos.

[00974] AA50. Método de AA31, no qual a classificação da informação digital compreende a classificação da informação digital, de tal modo que uma população das partículas apresentando a característica A e uma população das partículas apresentando a característica B corresponda a um modelo de computador de três populações incluindo um primeiro modelo de população de partículas apresentando a característica A, uma segunda população de modelo de partículas apresentando a característica B e uma terceira população de modelo de partículas desalinhadas, o dito modelo estimando a estatística de população para cada das primeira, segunda e terceira populações.

[00975] AA51. Método de AA31, no qual a classificação da informação digital compreende a classificação da informação digital como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A ou como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B.

BB. Determinando Parâmetros de Detecção Iniciais

[00976] BB1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema com-

preendendo um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação para separar as partículas de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de separação para prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[00977] um conversor do analógico para o digital que sincronicamente amostra uma saída analógica de variação de tempo originária do dito aparelho de citometria de fluxo e supre uma saída incluindo a informação digital correspondente à dita saída analógica de variação de tempo, no qual a dita saída analógica de variação de tempo e a informação digital correspondente são indicativas da característica A ou da característica B;

[00978] um processador de sinal digital que determina as características de fundo da dita saída analógica de variação de tempo a partir da dita informação;

[00979] a detecção de pulsos de forma de onda representados pela dita informação digital como uma função das ditas características de fundo determinadas; e

[00980] a provisão de um sinal de separação para o dito sistema de separação como uma função dos pulsos de forma de onda detectados.

[00981] BB2. Sistema de BB1, no qual o dito processador de sinal digital emprega um procedimento iterativo para determinar um limite de detecção de pulso para definir as características de fundo, o dito procedimento iterativo incluindo:

[00982] a computação de estimativas de estatística de fundo a partir da informação digital;

[00983] o uso das estimativas computadas para aplicar uma lógica

de detecção de pulso à dita informação digital a fim de identificar pulsos indicativos da característica A ou da característica B;

[00984] a recomputação das estimativas sem o uso da informação digital que corresponde aos pulsos identificados; e

[00985] a repetição do procedimento acima até que as estimativas de estatística de fundo converjam ou que um número máximo fixo de iterações ocorra.

[00986] BB3. Sistema de BB1, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para detectar pulsos de forma de onda representados pela informação digital, instruções para extrair características nos pulsos detectados e instruções para discriminar os pulsos detectados como uma função de suas características extraídas.

[00987] BB4. Sistema de BB3, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para definir um limite de decisão que discrimina entre as características extraídas que representam a característica A e as características extraídas que representam a característica B.

[00988] BB5. Sistema de BB4, no qual o dito processador de sinal digital ajusta a relativa localização do limite de decisão com relação às características extraídas que representam a característica A e com relação às características extraídas que representam a característica B como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00989] BB6. Sistema de BB1, que adicionalmente compreende um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de separação para variar sua estratégia de separação ou para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função

de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00990] BB7. Sistema de B1, no qual o dito processador de sinal digital compreende um processador de detecção de pulso para detectar pulsos de forma de onda representados pela informação digital, e no qual o dito processador de sinal digital classifica a informação digital como uma função dos pulsos de forma de onda detectados.

[00991] BB8. Sistema de BB7, que adicionalmente compreende um filtro para filtrar a saída analógica em uma frequência igual ou menor que metade de uma taxa de amostra do conversor, e no qual o conversor converte a saída analógica filtrada em informação digital correspondente.

CC. Gerando Parâmetros de Discriminação Iniciais

[00992] CC1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação para separar as partículas de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de separação para prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[00993] um conversor do analógico para o digital que sincronicamente amostra uma saída analógica de variação de tempo originária

do dito aparelho de citometria de fluxo e supre uma saída incluindo a informação digital que corresponde à dita saída analógica de variação de tempo, no qual a dita saída analógica de variação de tempo e a informação digital correspondente são indicativas da característica A ou da característica B; e

[00994] um processador de sinal digital gerando parâmetros de discriminação iniciais a partir da informação digital, discriminando a informação digital como uma função dos parâmetros de discriminação iniciais, e provendo um sinal de separação para o dito sistema de separação como uma função da informação digital discriminada.

[00995] CC2. Sistema de CC1, no qual o processador de sinal digital emprega pelo menos um dos seguintes algoritmos para gerar os parâmetros de discriminação iniciais: Meio k, Meio k Vago e Aglomerativo Hierárquico.

[00996] CC3. Sistema de CC1, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para detectar pulsos de forma de onda representados pela informação digital, instruções para extrair características nos pulsos de forma de onda detectados, e instruções para discriminar os pulsos de forma de onda detectados como uma função de suas características extraídas.

[00997] CC4. Sistema de CC3, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para detectar um limite de decisão que discrimina entre as características extraídas que representam a característica A e as características extraídas que representam a característica B.

[00998] CC5. Sistema de CC4, no qual o dito processador de sinal digital ajusta a relativa localização do limite de decisão com relação às características extraídas que representam a característica A com relação às características extraídas que representam a característica B como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou à partículas de ca-

racterística A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[00999] CC6. Sistema de CC1, que adicionalmente compreende um controle responsivo à informação recebida para o aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de separação para variar sua estratégia de separação ou para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza em pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B, e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

DD. Amostragem Sincrônica de Pulsos de Forma de Onda para Classificação

[001000] DD1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo:

[001001] um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, e um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características;

[001002] um conversor do analógico para o digital que sincronicamente amostra uma saída analógica de variação de tempo que compreende uma série de pulsos de forma de onda originários do dito apa-

relho de citometria de fluxo e a provisão de uma saída incluindo informação digital que corresponde aos ditos pulsos de forma de onda, onde os ditos pulsos de forma de onda e a dita informação digital correspondente são indicativos da característica A ou da característica B; e [001003] um processador de sinal digital que analisa a informação digital e classifica as partículas como uma função da informação digital analisada que corresponde à mesma.

[001004] DD2. Sistema de DD1, no qual o dito processador digital emprega um limite de detecção para definir os pulsos de forma de onda, e no qual o dito limite de detecção é uma função de uma estimativa média de fundo e um desvio padrão para a informação digital computada dentro de uma janela móvel de amostras que termina com a amostra corrente.

[001005] DD3. Sistema de DD1, no qual o controle digital emprega uma análise de detecção de anomalia estatística, e no qual a informação digital estatisticamente anômala originária das características de fundo da informação digital é considerada parte de um pulso digital.

[001006] DD4. Sistema de DD1, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para detectar pulsos que correspondem à informação digital, instruções para extrair características nos pulsos detectados e instruções para discriminar os pulsos detectados como uma função de suas características extraídas.

[001007] DD5. Sistema de DD4, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para definir um limite de decisão que discrimina entre as características extraídas que representam a característica A e as características extraídas que representam a característica B.

[001008] DD6. Sistema de DD5, no qual o dito processador de sinal digital ajusta a relativa localização do limite de decisão com relação às características extraídas que representam a característica A e com relação às características extraídas que representam a característica B

como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[001009] DD7. Sistema de DD1, que adicionalmente compreende um filtro para filtrar a saída analógica em uma frequência igual ou menor que uma metade de uma taxa de amostragem do conversor, e no qual o conversor converte a saída analógica filtrada em informação digital correspondente.

[001010] DD8. Sistema de DD1, que adicionalmente compreende um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar um sistema de separação para variar sua estratégia de separação ou para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou e partículas de característica B no dito fluxo.

[001011] DD9. Sistema de DD1, no qual o processador enumera as partículas classificadas apresentando a característica A ou a característica B.

[001012] DD10. Sistema de DD1, que adicionalmente compreende um dispositivo de iluminação pulsado em sincronização com a amostragem sincrônica para iluminar as partículas para produzir os pulsos de forma de onda correspondentes.

[001013] DD11. Sistema de DD10, no qual o dito processador de sinal digital compreende um processador de detecção de pulso para detectar os pulsos de forma de onda representados pela informação digital, e no qual o dito processador de sinal digital classifica a informação digital como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A ou como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B.

EE. Extração de Característica

[001014] EE1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação para separar as partículas de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de separação para prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[001015] um conversor do analógico para o digital que sincronicamente amostra uma saída analógica de variação de tempo originária do dito aparelho de citometria de fluxo e supre uma saída incluindo a informação digital que correspondente à saída analógica de variação de tempo, no qual a dita saída analógica de variação de tempo e a dita informação digital correspondente são indicativas da característica A ou da característica B;

[001016] um processador de sinal digital que extrai características da informação digital e supre um sinal de separação para o dito sistema de separação como uma função das características extraídas.

[001017] EE2. Aparelho de EE1, no qual a característica extraída corresponde a uma ou mais das seguintes características: área do pulso, pico do pulso, área interna do pulso, largura do pulso, gaussianidade do pulso, pico de retardamento de pulso ou grau de inclinação do pulso.

[001018] EE3. Aparelho de EE2, no qual a característica extraída compreende uma aproximação de um derivativo do pulso ou do grau de inclinação do pulso em um ponto do pulso com relação a uma altura de pico média do pulso.

[001019] EE4. Aparelho de EE3, no qual o dito ponto ao longo do pulso corresponde a um ponto no qual há uma diferença entre um primeiro derivativo e um pulso produzido por partículas apresentando característica A e um primeiro derivativo de um pulso produzido por partículas apresentando a característica B.

[001020] EE5. Aparelho de EE3, no qual a saída analógica de variação de tempo corresponde a um pulso de emissão de fluorescência originário das partículas, e no qual o dito ponto ao longo do pulso corresponde a um ponto no qual uma diferença entre um primeiro derivativo de um pulso produzido por partículas apresentando a característica A e um primeiro derivativo de um pulso produzido por partículas apresentando a característica B está em um máximo ou próximo deste.

[001021] EE6. Aparelho de EE3, no qual a saída analógica de variação de tempo corresponde a um pulso de emissão de fluorescência originário das partículas, e no qual o dito ponto ao longo do pulso é uma função de uma altura de pico dos pulsos de emissão de fluorescência.

[001022] EE7. Aparelho de EE1, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para detectar pulsos de forma de onda representados pela informação digital, instruções para extrair características

nos pulsos de forma de onda detectados, e instruções para discriminar os pulsos de forma de onda detectados como uma função de suas características extraídas.

[001023] EE8. Aparelho de EE7, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para definir um limite de decisão que discrimina entre as características extraídas que representam a característica A e as características extraídas que discriminam a característica B.

[001024] EE9. Aparelho de EE8, no qual o dito processador de sinal digital ajusta a relativa localização do limite de decisão com relação às características extraídas que representam a característica A e com relação às características extraídas que representam a característica B como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[001025] EE10. Aparelho de EE1, que adicionalmente compreende um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de separação para variar sua estratégia de separação ou para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[001026] EE11. Aparelho de EE1, no qual o dito processador de sinal

digital compreende um processador de detecção de pulso para detectar pulsos de forma de onda representados pela informação digital e para classificar os pulsos de forma de onda detectados.

[001027] EE12. Aparelho de EE11, que adicionalmente compreende um filtro para filtrar a saída analógica em uma frequência igual ou menor que metade de uma taxa de amostragem do conversor, e no qual o conversor converte a saída analógica filtrada em informação digital correspondente.

FF. Discriminando Pulsos de Forma de Onda

[001028] FF1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação para separar as partículas de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de separação para prover pelo menos uma população contendo partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[001029] um conversor do analógico para o digital que sincronicamente amostra uma saída analógica de variação de tempo compreendendo pulsos de forma de onda originários do dito aparelho de citometria de fluxo e supre uma saída incluindo a informação digital correspondente aos ditos pulsos de forma de onda, no qual os ditos pulsos de forma de onda e a informação digital correspondente são indicativos da característica A ou da característica B;

[001030] um processador de sinal digital que discrimina a informação digital como indicativa de característica A ou como indicativa de característica B e supre um sinal de separação para o dito sistema de sepa-

ração como uma função da informação digital discriminada.

[001031] FF2. Aparelho de FF1, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para detectar pulsos de forma de onda representados pela informação digital, instruções para extrair características nos pulsos de forma de onda detectados, e instruções para discriminar os pulsos de forma de onda detectados como uma função de suas características extraídas.

[001032] FF3. Aparelho de FF2, no qual o dito processador de sinal digital inclui instruções para definir um limite de decisão que discrimina entre as características extraídas que representam a característica A e características extraídas que representam a característica B.

[001033] FF4. Aparelho de FF3, no qual o dito processador de sinal digital ajusta a relativa localização do limite de decisão com relação às características extraídas que representam a característica A e com relação às características extraídas que representam a característica B como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[001034] FF5. Aparelho de FF1, no qual o dito processador de sinal digital compreende um processador de detecção de pulso para detectar pulsos de forma de onda que correspondem à informação digital, e no qual o dito processador de sinal digital classifica a informação digital como uma função dos pulsos de forma de onda detectados.

[001035] FF6. Aparelho de FF5, que adicionalmente compreende um filtro para filtragem da saída analógica de uma frequência igual ou menor que a metade de uma taxa de amostragem do conversor, e no qual

o conversor converte a saída analógica filtrada em informação digital correspondente.

[001036] FF7. Aparelho de FF1, que adicionalmente compreende um controle responsivo à informação digital recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de separação para varia sua estratégia de separação ou para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[001037] FF8. Aparelho de FF1, que adicionalmente compreende um dispositivo de iluminação pulsado em sincronização com a amostragem sincrônica para iluminar as partículas para produzir os pulsos de forma de onda correspondentes.

[001038] FF9. Aparelho de FF8, no qual o dito processador de sinal digital compreende um processador de detecção de pulso para detectar pulsos de forma de onda representados pela informação digital, e no qual o dito processador de sinal digital classifica a informação digital como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A ou como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B.

GG. Sensor de Ruptura de Disposição de LED

[001039] GG1. Aparelho para uso com um fluxo contínuo de fluido que está sendo rompido em gotículas em uma localização de ruptura, que compreende:

[001040] uma fonte de luz posicionada em um lado do fluxo para ilu-

minar o fluxo;

[001041] uma fotodisposição linear posicionada no outro lado do fluxo adaptada para ser orientada ao longo de um eixo substancialmente paralelo ao fluxo, a dita fotodisposição adaptada para detectar luz originária da fonte de luz que passa através do fluxo e a dita fotodisposição adaptada para prover um sinal de saída que corresponde à luz detectada;

[001042] um controle para receber o sinal de saída e prover um sinal de localização correspondendo a uma localização da localização de ruptura.

[001043] GG2. Aparelho de GG1, que adicionalmente compreende uma tela para prover uma visualização que indica a localização da localização de ruptura.

[001044] GG3. Aparelho de GG1, que adicionalmente compreende um transdutor que aplica uma força ao fluxo para variar a localização da localização de ruptura, o dito transdutor variando uma amplitude da força como uma função de um sinal de entrada, e no qual o sinal de localização originário do detector é provido ao transdutor como o sinal de entrada.

[001045] GG4. Aparelho de GG3, que adicionalmente compreende uma tabela de consulta para especificar as variações da amplitude da força aplicada ao fluxo como uma função da localização da localização de ruptura.

HH. Sensor de Ruptura de Citometria de Fluxo

[001046] HH1. Sistema de citometria de fluxo para separar uma mistura de partículas incluindo partículas apresentando uma característica A e partículas apresentando uma característica B, o dito sistema compreendendo um sistema de distribuição de fluido para dispensar um fluido contendo as ditas partículas, um aparelho de citometria de fluxo para receber o dito fluido, transformá-lo em um fluxo e usar a citome-

tria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características, e um sistema de separação para separar as partículas de acordo com a dita classificação e de acordo com uma estratégia de separação para prover pelo menos uma população contendo as partículas desejadas, o aperfeiçoamento compreendendo:

[001047] uma fonte de luz posicionada na segunda localização em um lado do fluxo para iluminar o fluxo;

[001048] uma fotodisposição linear posicionada na segunda localização no outro lado do fluxo adaptada para ser orientada ao longo de um eixo substancialmente paralelo ao fluxo, a dita fotodisposição adaptada para detectar luz da fonte de luz que passa através do fluxo e a dita fotodisposição adaptada para prover um sinal de saída correspondendo à luz detectada;

[001049] um controle para receber o sinal de saída indicativo de uma posição da segunda localização, o dito controle variando a operação do dito transdutor como uma função do sinal de saída.

[001050] HH2. Aparelho de HH1, que adicionalmente compreende um controle responsivo à informação recebida do aparelho de citometria de fluxo para controlar o sistema de separação para variar sua estratégia de separação ou para controlar o sistema de distribuição de fluido para variar a taxa na qual o fluido é dispensado como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de pelo menos uma dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e (2) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à dita quantidade total de partículas de característica A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

[001051] HH3. Aparelho de HH1, que adicionalmente compreende uma tela para prover uma visualização que indica a localização da localização de ruptura.

[001052] HH4. Aparelho de HH1, que adicionalmente compreende um transdutor que aplica uma força ao fluxo para variar a localização da localização de ruptura, o dito transdutor variando uma amplitude da força como uma função de um sinal de entrada, e no qual o sinal de localização originário do detector é provido ao transdutor como o sinal de entrada.

[001053] HH5. Aparelho de HH4, que adicionalmente compreende uma tabela de consulta para especificar as variações da amplitude da força aplicada ao fluxo como uma função da localização da localização de ruptura.

II. Separador de Gotículas Apresentando Óptica de Epi-iluminação

[001054] II1. Aparelho para separar partículas contidas em um fluxo de fluido de acordo com uma ou mais características das partículas, o dito sistema compreendendo:

[001055] um aparelho de citometria de fluxo para dispensar um fluxo de fluido contendo as ditas partículas a uma primeira localização e fazer com que um fluxo se rompa em gotículas em uma segunda localização, o dito aparelho de citometria de fluxo sendo operável com o uso de citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características e para separar as ditas gotículas de acordo com a classificação das partículas contidas nas gotículas;

[001056] o dito aparelho de citometria de fluxo compreendendo um sistema óptico de epi-iluminação incluindo uma lente de focalização, o dito sistema óptico sendo operável para direcionar um feixe de laser através da dita lente de focalização em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe que intersecta o fluxo de fluido na dita primeira localização, de modo que as ditas células de esperma passem através do feixe, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das células direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira.

- [001057] II2. Aparelho de II1, no qual as ditas partículas são células.
- [001058] II3. Aparelho de II1, no qual as ditas partículas são células de esperma.
- [001059] II4. Sistema de II3, no qual o dito feixe é focalizado pelo dito sistema óptico como um ponto no fluxo de fluido na dita primeira localização, o dito ponto apresentando uma forma geralmente elíptica com um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos à direção do escoamento do fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralelo à direção do escoamento do fluxo de fluido, a dita largura sendo menor que o comprimento da cabeça de um esperma que passa através do ponto.
- [001060] II5. Aparelho de II3, no qual o dito sistema óptico inclui um único fotodetector na parte detrás da dita lente de focalização para detectar as ditas emissões.
- [001061] II6. Aparelho de II1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo adicionalmente compreende um bocal que apresenta uma superfície interna configurada para exercer uma força sobre as partículas que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes da passagem através do dito feixe.
- [001062] II7. Aparelho de II4, no qual o dito bocal é girável em torno de um eixo longitudinal do bocal para ajustar a dita orientação de partículas desejada com relação ao eixo de feixe.
- [001063] II8. Aparelho de II1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende um bocal orientado para direcionar o fluxo de fluido em uma direção não-vertical ascendente.
- [001064] II9. Aparelho de II1, no qual o dito bocal apresenta uma superfície externa revestida com um revestimento não-emissivo e não-refletivo.
- [001065] II10. Aparelho de II1, no qual o dito sistema óptico inclui um

único fotodetector na parte detrás da dita lente de focalização para detectar as ditas emissões.

[001066] II11. Aparelho de II1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende um bocal apresentando um orifício de bocal, e um tubo capilar que se estende do orifício através do qual o dito fluxo de fluido é dispensado para a dita primeira localização.

[001067] II12. Aparelho de II19, no qual a dita primeira localização está dentro do dito tubo capilar.

[001068] II13. Sistema de II1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo operáveis para analisarem múltiplos fluxos de fluido simultaneamente, cada unidade de citometria de fluxo compreendendo o dito sistema óptico de epi-iluminação.

JJ. Método de Separar Partículas com o Uso da Óptica de Epi-iluminação

[001069] JJ1. Método de separar partículas contidas em um fluxo de fluido de acordo com uma ou mais características das partículas, o dito método compreendendo:

[001070] a distribuição de um fluxo de fluido contendo as ditas partículas em uma primeira localização e a ruptura das gotículas em uma segunda localização; e

[001071] o uso de um processo de citometria de fluxo para classificar as partículas de acordo com as ditas características e para separar as ditas gotículas de acordo com a classificação de partículas contidas nas gotículas,

[001072] o dito processo de citometria de fluxo compreendendo o direcionamento de um feixe de laser através de uma lente de focalização em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe que intersecta o fluxo de fluido na dita primeira localização, de modo que as ditas células passem através do feixe, resultando em emissões de ra-

dição eletromagnética originária das células direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira.

[001073] JJ2. Método de JJ1, no qual as ditas partículas são células.

[001074] JJ3. Método de JJ1, no qual as ditas partículas são células de esperma.

[001075] JJ4. Método de JJ3, no qual a etapa de dispensar um fluxo de fluido compreende o direcionamento do dito fluxo através de um bocal apresentando um diâmetro de 50 a 70 microns em uma pressão de 237 – 275 kPa (20-40 psi) e em uma taxa de 30.000 a 50.000 células de esperma por segundo.

[001076] JJ5. Método de JJ3, que adicionalmente compreende a focalização do dito feixe no dito fluxo de fluido como um ponto de forma geralmente elíptica apresentando um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos à direção do escoamento do fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralela à direção do escoamento do fluxo de fluido, a dita largura sendo menor que o comprimento da cabeça de uma célula de esperma que passa através do ponto de feixe.

[001077] JJ6. Método de JJ5, no qual a cabeça da dita célula de esperma inclui uma região de DNA que apresenta um comprimento na direção do fluxo de fluido, e no qual a dita largura do ponto de feixe é menor que o comprimento da dita região de DNA.

[001078] JJ7. Método de JJ3, que adicionalmente compreende a geração de uma pluralidade de fluxos de fluido separados contendo, cada qual, células de esperma e, para cada dito fluxo, a execução das etapas (a)(b).

[001079] JJ8. Método de JJ7, que adicionalmente compreende o uso de um feixe de laser comum para iluminar os ditos fluxos de fluido.

[001080] JJ9. Método de JJ1, que adicionalmente compreende a

aplicação de uma força sobre as partículas que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes da passagem através do dito feixe.

[001081] JJ10. Método de JJ4, que adicionalmente compreende o escoamento do fluxo de fluido através de um bocal configurado para aplicação da dita força, e a rotação do dito bocal em torno de um eixo longitudinal do bocal para ajustar a dita orientação de partículas desejada para o eixo de feixe.

[001082] JJ11. Método de JJ1, no qual o dito processo de citometria de fluxo adicionalmente compreende o uso de apenas um detector para detectar a emissão de radiação eletromagnética.

KK. Separador por Fotodeterioração Apresentando a Óptica de Epi-iluminação

[001083] KK1. Aparelho para separar partículas contidas em um fluxo de fluido de acordo com uma ou mais características das partículas, o dito sistema compreendendo:

[001084] um aparelho de citometria de fluxo para distribuir um fluxo de fluido contendo as ditas partículas em uma primeira localização, classificar as partículas de acordo com as ditas características, e separar as ditas partículas de acordo com a dita classificação em pelo menos uma população contendo as partículas desejadas; e

[001085] um laser para remover as partículas no dito fluxo;

[001086] o dito aparelho de citometria de fluxo compreendendo um sistema óptico de epi-iluminação incluindo uma lente de focalização, o dito sistema óptico sendo operável para direcionar um feixe de laser através da dita lente de focalização em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe que intersecta o fluxo de fluido na dita primeira localização, de modo que as ditas células passem através do feixe, resultando em emissões de radiação eletromagnética originárias das células direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira.

[001087] KK2. Aparelho de KK1, no qual as ditas partículas são células.

[001088] KK3. Aparelho de KK2, no qual as ditas células são células de esperma.

[001089] KK4. Aparelho de KK1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo adicionalmente compreende um bocal apresentando uma superfície interna configurada para exercer uma força sobre as partículas que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes da passagem do dito feixe.

[001090] KK5. Aparelho de KK4, no qual o dito bocal é girável em torno de um eixo longitudinal do bocal para ajustar adita partícula desejada com relação ao eixo de feixe.

[001091] KK6. KK1 (copiar reivindicações AA2, etc.).

LL. Método de Separar Partículas Usando a Óptica de Epiluminação e a Fotodeterioração

[001092] LL1. Método de separar partículas contidas em um fluxo de fluido, de acordo com uma ou mais características das partículas, o dito método compreendendo:

[001093] o uso de um processo de citometria de fluxo para classificar partículas em um fluxo de fluido de acordo com as ditas características e para separar as ditas partículas de acordo com a dita classificação de partículas; e

[001094] a ablação de partículas no dito fluxo de fluido,

[001095] o dito processo de citometria de fluxo compreendendo o direcionamento de um feixe de laser através de uma lente de focalização em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe que intersecta o fluxo de fluido, de modo que as ditas células passem através do feixe, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das células direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira.

MM. Separador de Espermas Apresentando a Óptica de Epi-iluminação

[001096] MM1. Sistema para separar células de esperma de acordo com as características de DNA dos cromossomos, que compreende:

[001097] um aparelho de citometria de fluxo para dispensar um fluxo de fluido contendo as ditas células em uma primeira localização e para fazer com que o dito fluxo se rompa em gotículas em uma segunda localização, o dito aparelho de citometria de fluxo sendo operável para classificar as células de acordo com as ditas características de DNA e para separar as ditas gotículas de acordo com a classificação das células contidas nas gotículas,

[001098] o dito aparelho de citometria de fluxo compreendendo um sistema óptico de epi-iluminação incluindo uma lente de focalização, o dito sistema óptico sendo operável para direcionar um feixe de laser através da dita lente de focalização em uma direção dianteira e ao longo de um eixo de feixe que intersecta o fluxo de fluido na dita primeira localização, de modo que as ditas células passem através do feixe, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das células direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira.

[001099] MM2. Sistema de MM1, no qual o dito sistema óptico adicionalmente compreende um fotodetector no dito eixo de feixe na parte detrás da dita lente de focalização operável para detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos indicativos das ditas características de DNA.

[001100] MM3. Sistema de MM1, no qual as ditas gotículas são separadas em primeiras gotículas, cada uma das quais contendo pelo menos uma célula de esperma X viva, e segundas gotículas, cada uma das quais contendo pelo menos uma célula Y.

[001101] MM4. Sistema de MM3, no qual pelo menos algumas das

primeiras gotículas contêm uma célula X viva e uma célula Y viva.

[001102] MM5. Sistema de MM1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende um bocal que apresenta uma superfície interna configurada para exercer uma força sobre as células que tende a trazê-la para uma orientação desejada antes da passagem através do dito feixe.

[001103] MM6. Sistema de MM5, no qual o dito bocal é girável em torno de um eixo longitudinal do bocal para ajustar a dita orientação de célula desejada com relação ao eixo de feixe.

[001104] MM7. Sistema de MM1, no qual o dito eixo de feixe intersecta o fluxo de fluido em um ângulo de incidência que é oblíquo com relação a um eixo longitudinal do fluxo na dita primeira localização.

[001105] MM8. Sistema de MM1, no qual o dito feixe é focalizado pelo dito sistema óptico com um ponto no fluxo de fluido na dita primeira localização, o dito ponto apresentando uma forma geralmente elíptica com um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos à direção do escoamento de fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralela à direção do escoamento do fluxo de fluido, a dita largura sendo menor que o comprimento da cabeça de uma célula de esperma que passa através do ponto de feixe.

[001106] MM9. Sistema de MM8, no qual a cabeça da dita célula de esperma inclui uma região de DNA que apresenta um comprimento na direção do fluxo de fluido, e no qual a dita largura do ponto de feixe é menor que o comprimento da dita região de DNA.

[001107] MM10. Sistema de MM1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo operáveis para analisar múltiplos fluxos de fluido simultaneamente, cada unidade de citometria de fluxo compreendendo o dito sistema óptico de epi-iluminação.

[001108] MM11. Sistema de MM1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende um bocal orientado para direcionar o fluxo de fluido em uma direção ascendente não-vertical.

[001109] MM12. Sistema de MM1, no qual o dito sistema óptico inclui apenas um fotodetector para detectar as ditas emissões.

[001110] MM13. Sistema de MM1, que adicionalmente compreende um coletor para coletar pelo menos as ditas primeiras gotículas.

[001111] MM14. Sistema de MM1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende um bocal apresentando um orifício de bocal, e um tubo capilar que se estende a partir do orifício através do qual o dito fluxo de fluido é dispensado para a dita primeira localização.

[001112] MM15. Sistema de MM14, no qual a dita primeira localização está dentro do dito tubo capilar.

[001113] MM16. Sistema de MM15, no qual o dito sistema óptico é opticamente acoplado ao dito tubo capilar para transmissão do feixe no fluxo que flui através do tubo.

NN. Método de Separação de Espermatozoides que Usa uma Óptica de Epi-iluminação

[001114] NN1. Método de separar células de espermatozoides de animais de acordo com suas características de DNA, que compreende as etapas de:

[001115] dispensar um fluxo de fluido contendo as ditas células em uma primeira localização e fazer com que um fluxo seja rompido em gotículas em uma segunda localização;

[001116] direcionar um feixe de laser através de uma lente de focalização em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe que intersecta o fluxo de fluido na dita primeira localização, de modo que as ditas células passem através do feixe, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das células direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira;

[001117] detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos indicativos das ditas características de DNA;

[001118] processar os ditos sinais elétricos e classificar as células de acordo com as ditas características de DNA; e

[001119] separar as ditas gotículas de acordo com a classificação de células contidas nas gotículas.

[001120] NN2. Método de NN1, no qual as ditas gotículas são separadas em primeiras gotículas, cada uma das quais contendo pelo menos uma célula de esperma X viva, e segundas gotículas, cada uma das quais contendo pelo menos uma célula Y.

[001121] NN3. Método de NN2, no qual pelo menos parte das ditas primeiras gotículas contém uma célula X viva e uma célula Y viva.

[001122] NN4. Método de NN1, no qual a etapa (a) compreende o direcionamento do dito fluxo através de um orifício de bocal apresentando um diâmetro de 50 a 70 microns em uma pressão de 137,5 – 275 kPa (20-40 psi) e em uma taxa de 30.000 a 50.000 células de esperma por segundo.

[001123] NN5. Método de NN1, que adicionalmente compreende a aplicação de uma força sobre as células que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes da passagem através do dito feixe.

[001124] NN6. Método de NN5, no qual as ditas células de esperma apresentam cabeças com faces largas e bordas estreitas, e no qual a dita orientação desejada é aquela onde o feixe atinge as ditas faces largas.

[001125] NN7. Método de NN6, no qual a dita etapa de distribuição de fluido compreende o direcionamento do dito fluxo através de um bocal, e no qual o dito método adicionalmente compreende a rotação do bocal em torno de um eixo longitudinal do bocal para ajustar a dita orientação de célula desejada com relação ao dito eixo de feixe.

[001126] NN8. Método de NN1, que adicionalmente compreende a

focalização do dito feixe no dito fluxo de fluido como um ponto de forma geralmente elíptica apresentando um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos para a direção do escoamento do fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralela à direção do escoamento de fluxo de fluido, a dita largura sendo menor que o comprimento da cabeça de uma célula de esperma que passa através do ponto de feixe.

[001127] NN9. Método de NN8, no qual a cabeça da dita célula de esperma inclui uma região de DNA que apresenta um comprimento na direção do fluxo de fluido, e no qual a dita largura de ponto de feixe é menor do que o comprimento da dita região de DNA.

[001128] NN10. Método de NN5, no qual a etapa(d) compreende a deflexão de pelo menos as ditas primeiras gotículas.

[001129] NN11. Método de NN1, que adicionalmente compreende o direcionamento de pelo menos parte das ditas emissões através de um sistema de filtragem incluindo um filtro espacial que apresenta uma abertura com as dimensões de comprimento e largura, pelo menos uma das ditas dimensões sendo ajustáveis para variar o tamanho da abertura.

[001130] NN12. Método de NN1, que adicionalmente compreende o direcionamento do dito fluxo de fluido ao longo de uma trajetória ascendente não-vertical.

[001131] NN13. Método de NN1, que adicionalmente compreende a geração de uma pluralidade de fluxos de fluido separados, cada qual contendo células de esperma, e, para cada dito fluxo, a execução das etapas (a), (b), (c) e (d).

[001132] NN13A. Método de NN13, que adicionalmente compreende o uso de um feixe de laser comum para iluminar os ditos fluxos de fluido.

[001133] NN14. Método de NN13, no qual os ditos fluxos de fluido contêm fluido originário de um suprimento de fluido comum.

[001134] NN15. Método de NN1, no qual o dito fluxo de fluido é dispensado na dita primeira localização através de um tubo capilar.

OO. Analisador de Espermas Apresentando uma Óptica de Epi-iluminação

[001135] OO1. Aparelho para classificar células de esperma de animais por meio das características de DNA dos cromossomos, que compreende:

[001136] um sistema de bocal para dispensar um fluxo de fluido contendo células de esperma em uma primeira localização e para exercer uma força sobre as células de esperma que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes que o fluxo alcance a dita primeira localização;

[001137] um sistema óptico de epi-iluminação para direcionar um feixe de radiação eletromagnética em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe que intersecta o dito fluxo de fluido na dita primeira localização em um ângulo de incidência diferente de 0 grau, de modo que as ditas células passem através do feixe, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das células direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira;

[001138] um fotodetector operável para detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos indicativos das ditas características de DNA; e

[001139] um processador para processar os ditos sinais elétricos e classificar as células de acordo com as ditas características de DNA.

[001140] OO2. Aparelho de OO1, no qual o dito sistema de bocal é parte de um sistema de separação de célula de gotículas.

[001141] OO3. Aparelho de OO1, no qual o dito sistema de bocal é parte de um sistema de separação de célula por fotodeterioração.

[001142] OO4. Aparelho de OO1, no qual o dito sistema de bocal é parte de um sistema de separação de ligação de fluido.

[001143] OO5. Aparelho de OO1, no qual o dito sistema óptico adicionalmente compreende um fotodetector no dito eixo de feixe na parte detrás da dita lente de focalização operável para detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos indicativos das ditas características de DNA.

[001144] OO6. Aparelho de OO1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende um bocal apresentando uma superfície interna configurada para exercer uma força sobre as células que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes da passagem através do dito feixe.

[001145] OO7. Aparelho de OO6, no qual o dito bocal é girável em torno de um eixo longitudinal do bocal para ajustar a dita orientação de célula desejada com relação ao dito eixo de feixe.

[001146] OO8. Aparelho de OO1, no qual o dito eixo de feixe intersecta o fluxo de fluido em um ângulo de incidência que é oblíquo com relação a um eixo longitudinal do fluxo na dita primeira localização.

[001147] OO9. Aparelho de OO1, no qual o dito feixe é focalizado pelo dito sistema óptico como um ponto no fluxo de fluido na dita primeira localização, o dito ponto apresentando uma forma geralmente elíptica com um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos para a direção do escoamento do fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralela à direção do escoamento do fluxo de fluido, a dita largura sendo menor que o comprimento da cabeça de um espermatozoário que passa através do ponto de feixe.

[001148] OO10. Aparelho de OO9, no qual a cabeça da dita célula de espermatozoário inclui uma região de DNA que apresenta um comprimento na direção do escoamento do fluxo, e no qual a dita largura de ponto

de feixe é menor do que o comprimento da dita região de DNA.

[001149] OO11. Aparelho de OO1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo operáveis em paralelo para analisar múltiplos fluxos de fluido simultaneamente, cada unidade de citometria de fluxo compreendendo o dito sistema óptico de epi-iluminação.

[001150] OO12. Aparelho de OO1, no qual o dito sistema de bocal compreende um bocal orientado para direcionar o fluxo de fluido em uma direção ascendente não-vertical.

[001151] OO13. Aparelho de OO1, no qual o dito sistema óptico inclui apenas um fotodetector para detectar as ditas emissões.

[001152] OO14. Aparelho de OO1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende um bocal apresentando um orifício de bocal, e um tubo capilar se estendendo a partir do orifício através do qual o dito fluxo de fluido é dispensado na dita primeira localização.

[001153] OO15. Aparelho de OO14, no qual a dita primeira localização está dentro do dito tubo capilar.

[001154] OO16. Aparelho de OO15, no qual o dito sistema óptico é opcionalmente acoplado ao dito tubo capilar para transmissão do feixe no fluxo que flui através do tubo.

PP. Método de Analisar Espermatozoides Usando a Óptica de Epi-iluminação

[001155] PP1. Método de classificar células de espermatozoides de animais por meio das características de DNA, que compreende as etapas de:

[001156] dispensar um fluxo de fluido contendo células de espermatozoides em uma primeira localização e exercer uma força sobre as células de espermatozoides que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes que o fluxo alcance a dita primeira localização;

[001157] (d) direcionar um feixe de radiação eletromagnética em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe que intersecta o

dito fluxo de fluido na dita primeira localização em um ângulo de incidência diferente do fluxo de 0 grau, de modo que as ditas células passem através do feixe, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das células direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira;

[001158] (c) detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos indicativos das ditas características de DNA; e

[001159] (d) processar os ditos sinais elétricos e classificar as células de acordo com as ditas características de DNA.

[001160] PP2. Método de PP1, que adicionalmente compreende a separação das ditas células de acordo com as ditas características de DNA.

[001161] PP3. Método de PP1, que adicionalmente compreende o uso de um processo de separação por fotodeterioração para separar as ditas células.

[001162] PP4. Método de PP1, que adicionalmente compreende o uso de um processo de separação por ligação de fluido para separar as ditas células.

[001163] PP5. Método de PP1, que adicionalmente compreende o uso de um processo de separação de gotículas para separar as ditas células.

[001164] PP6. Método de PP1, no qual a etapa (a) compreende o direcionamento do dito fluxo através de um orifício de bocal apresentando um diâmetro de 50 a 70 microns em uma pressão de 137,5-275 kPa (20-40 psi) em uma taxa de 30.000 a 50.000 células de esperma por segundo.

[001165] PP7. Método de PP1, que adicionalmente compreende a aplicação de uma força sobre as células de esperma que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes da passagem através do dito feixe.

[001166] PP8. Método de PP7, no qual as ditas células de espermatozoides apresentam cabeças com faces largas e bordas estreitas, e no qual a dita orientação desejada é aquela onde o feixe atinge as ditas faces largas.

[001167] PP9. Método de PP8, no qual a dita etapa de distribuição de fluido compreende o direcionamento do dito fluxo através de um bocal, e no qual o dito método adicionalmente compreende a rotação do bocal em torno e um eixo longitudinal do bocal para ajustar a dita orientação de célula desejada com relação ao eixo de feixe.

[001168] PP10. Método de PP1, que adicionalmente compreende a focalização do dito feixe no dito fluxo de fluido como um ponto de forma geralmente elíptica apresentando um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos para a direção do escoamento de fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralela à direção do escoamento do fluxo de fluido, a dita largura sendo menor do que o comprimento da cabeça de uma célula de espermatozoides que passa através do ponto de feixe.

[001169] PP11. Método de PP10, no qual a cabeça da dita célula de espermatozoides inclui uma região de DNA apresentando um comprimento na direção do escoamento do fluxo, e no qual a dita largura do ponto de feixe é menor do que o comprimento da dita região de DNA.

[001170] PP12. Método de PP1, que adicionalmente compreende o direcionamento de pelo menos parte das ditas emissões através de um sistema de filtragem que inclui um filtro espacial apresentando uma abertura com dimensões de comprimento e largura, pelo menos uma das ditas dimensões sendo ajustável para variar o tamanho da abertura.

[001171] PP13. Método de PP1, que adicionalmente compreende o direcionamento do dito fluxo de fluido ao longo de uma trajetória as-

cendente não-vertical.

[001172] PP14. Método de PP1, que adicionalmente compreende a geração de uma pluralidade de fluxos de fluido separados contendo, cada qual, células de esperma e, para cada dito fluxo, a execução das etapas (a), (b), (c) e (d).

[001173] PP15. Método de PP14, que adicionalmente compreende o uso de um feixe de laser comum para iluminar os ditos fluxos de fluido.

[001174] PP16. Método de PP14, no qual os ditos fluxos de fluido contêm fluido originário de um suprimento comum de fluido.

[001175] PP17. Método de PP1, no qual o dito fluxo de fluido é dispensado na dita primeira localização através de um tubo capilar.

QQ. Analisador de Partículas Apresentando um Ângulo Oblíquo de Óptica de Epi-iluminação de Incidência

[001176] QQ1. Aparelho para analisar partículas contidas em um fluxo de fluido, que compreende:

[001177] um sistema óptico de epi-iluminação para direcionar um feixe de radiação eletromagnética em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe que intersecta o dito fluxo de fluido em um ângulo de incidência que é oblíquo com relação a um eixo longitudinal do fluxo de fluido;

[001178] o dito sistema de epi-iluminação incluindo uma lente de focalização no dito percurso de eixo de feixe para focalizar o dito feixe de radiação eletromagnética no fluxo de fluido como um ponto, as ditas partículas sendo adaptadas para passagem através do dito ponto, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das partículas direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira; e

[001179] um fotodetector na parte detrás da lente de focalização para detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos para ser processada para se obter informação referente às

ditas partículas.

[001180] QQ2. Aparelho de QQ1, no qual o dito ângulo de incidência está na faixa de 5 a 45 graus.

[001181] QQ3. Aparelho de QQ1, no qual o dito ângulo de incidência está na faixa de 15 a 30 graus.

[001182] QQ4. Aparelho de QQ1, no qual as ditas partículas são células, e no qual a dita informação se refere às características das células.

[001183] QQ5. Aparelho de QQ1, no qual as ditas partículas são células de esperma, e no qual a dita informação se refere às características de DNA dos cromossomos X/Y das células.

[001184] QQ6. Aparelho de QQ5, que adicionalmente compreende um sistema de bocal para direcionar o dito fluxo de fluido e para exercer uma força sobre as células de esperma que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes que o fluxo passe através do dito feixe.

[001185] QQ7. Aparelho de QQ1, no qual o dito sistema de bocal compreende um bocal, e no qual o dito feixe atinge o dito fluxo de fluido em uma localização menor do que 1,0 mm a partir do bocal.

[001186] QQ8. Aparelho de QQ1, que adicionalmente compreende um sistema de separação de célula de gotículas para separar as ditas partículas de acordo com a dita informação.

[001187] QQ9. Aparelho de QQ1, que adicionalmente compreende um sistema de separação de gotículas por fotodeterioração para separar as ditas partículas de acordo com a dita informação.

[001188] QQ10. Aparelho de QQ1, que adicionalmente compreende um sistema de separação de células de ligação de fluido para separar as ditas partículas de acordo com a dita informação.

RR. Método de Analisar Partículas Usando a Óptica de Epi-iluminação Distorcida

[001189] RR1. Método de analisar partículas contidas em um fluxo

de fluido, que compreende:

[001190] o direcionamento de um feixe de radiação eletromagnética em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe que intersecta o dito fluxo de fluido em um ângulo de incidência que é oblíquo com relação a um eixo longitudinal do fluxo de fluido;

[001191] a focalização do dito feixe de radiação eletromagnética no fluxo de fluido como um ponto, as ditas partículas sendo adaptadas para passarem através do dito ponto, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das partículas direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira;

[001192] a detecção e a conversão de pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos indicativos de características das partículas; e

[001193] o processamento dos ditos sinais elétricos para obter informação referente às ditas características.

[001194] RR2. RR1 (acrescentar reivindicações similares à QQ2, etc.).

SS. Analisador de Células Apresentando a Óptica de Epi-iluminação e Foco de Ponto Elíptico

[001195] SS1. Aparelho para analisar características de DNA de células em um fluxo de fluido, cada célula compreendendo uma região de DNA apresentando um comprimento na direção do fluxo de fluido, o dito aparelho compreendendo:

[001196] um sistema óptico de epi-iluminação para direcionar um feixe de radiação em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe, de modo que o feixe intersecte o dito fluxo de fluido;

[001197] o dito sistema óptico incluindo uma lente de focalização no dito eixo de feixe para focalizar o feixe no fluxo de fluido como um ponto geralmente elíptico apresentando um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos para a di-

reção do escoamento do fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralelo à direção do escoamento do fluxo de fluido, a largura do ponto de feixe sendo menor que o comprimento da dita região de DNA, as ditas células sendo adaptadas para passarem através do dito ponto, resultando em uma emissão de radiação eletromagnética originárias das células dirigidas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira, incluindo emissões das ditas regiões de DNA indicativas das ditas características de DNA;

[001198] um fotodetector na parte detrás da lente de focalização para detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões das ditas regiões de DNA em sinais elétricos indicativos das ditas características de DNA; e

[001199] um sistema para processar os ditos sinais elétricos, identificar as ditas características de DNA, e classificar as células de acordo com as ditas características de DNA.

[001200] SS2. Aparelho de SS1, no qual cada largura do ponto é menor do que cerca de $3,0\ \mu\text{m}$.

[001201] SS3. Aparelho de SS2, no qual o dito comprimento do ponto é maior do que cerca de $80\ \mu\text{m}$.

[001202] SS4. Aparelho de SS1, no qual as ditas células são células de esperma e as ditas características de DNA são indicativas do sexo das células de esperma.

[001203] SS5. Aparelho de SS1, que adicionalmente compreende um sistema de bocal para exercer uma força sobre as células no fluxo que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes que o fluxo passe através do dito feixe.

[001204] SS6. Aparelho de SS1, que adicionalmente compreende um sistema de separação de célula de gotículas para armazenar as ditas partículas de acordo com as ditas características de DNA.

[001205] SS7. Aparelho de SS1, que adicionalmente compreende um sistema de separação de célula por fotodeterioração para separar as ditas partículas de acordo com as ditas características de DNA.

[001206] SS8. Aparelho de SS1, que adicionalmente compreende um sistema de separação de célula de ligação de fluido para separar as ditas partículas de acordo com as características de DNA.

[001207] SS9. Aparelho para analisar as características de DNA dos cromossomos de células de esperma de animais em um fluxo de fluido apresentando uma direção de escoamento, cada célula de esperma apresentando uma cabeça com um núcleo compreendendo uma região de cromossomos localizada contendo pelo menos um cromossomo, o dito núcleo apresentando um comprimento na direção do fluxo de fluido, o dito aparelho compreendendo:

[001208] um sistema óptico para focalizar um feixe de radiação eletromagnética no fluxo de fluido como um ponto geralmente elíptico apresentando um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos para a direção de fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralela à direção do fluxo de fluido, a largura do ponto de feixe sendo menor que o comprimento do dito núcleo, as ditas células de esperma sendo adaptadas para passarem através do dito ponto resultando em uma emissão de radiação eletromagnética das células de esperma, incluindo emissões originárias das ditas regiões de cromossomos indicativas das características de cromossomos das regiões;

[001209] um fotodetector para detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões originárias das regiões de cromossomos em sinais elétricos indicativos das ditas características dos cromossomos; e

[001210] um processador para processar os ditos sinais elétricos, identificar as ditas características dos cromossomos, e classificar as células de esperma de acordo com as ditas características dos cro-

mossomos.

[001211] SS10. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS9, no qual as ditas características dos cromossomos são indicativas do sexo das células de esperma.

[001212] SS11. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS10, no qual as ditas células de esperma são células de esperma bovino.

[001213] SS12. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS10, no qual a dita região de cromossomos é localizada dentro de uma área do núcleo que se estende em não mais do cerca de 20% do comprimento do núcleo em cada lado de um centro longitudinal do núcleo.

[001214] SS13. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS10, no qual a dita região de cromossomos é localizada dentro de uma área do núcleo que se estende em não mais do que cerca de 10% - 15% do comprimento do núcleo em cada lado de um centro longitudinal do núcleo.

[001215] SS14. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS9, que adicionalmente compreende um conversor do analógico para o digital que sincronicamente amostra uma saída analógica de variação de tempo originária do dito fotodetector e supre uma saída incluindo informação digital que corresponde à dita saída analógica de variação de tempo, no qual a dita saída analógica de variação de tempo e a informação digital correspondente são indicativas das ditas características dos cromossomos, e no qual o dito processador compreende um processador de sinal digital que analisa e classifica a informação digital.

[001216] SS15. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS9, no qual a dita largura do ponto é menor do que cerca de 3,0 μm .

[001217] SS16. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS15, no qual o dito comprimento do ponto é de cerca de 80 μm .

[001218] SS17. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS9, que

adicionalmente compreende um sistema de bocal para exercer uma força sobre as células de esperma no fluxo que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes que o fluxo passe através do dito feixe.

[001219] SS18. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS9, que adicionalmente compreende um sistema de separação de célula de gotículas para separar as ditas células de esperma de acordo com as ditas características de DNA dos cromossomos.

[001220] SS19. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS9, que adicionalmente compreende um sistema de separação de célula de esperma por fotodeterioração para separar as ditas células de esperma de acordo com as ditas características de DNA dos cromossomos.

[001221] SS20. Aparelho, de acordo com a reivindicação SS9, que adicionalmente compreende um sistema de separação de célula de esperma de ligação de fluido para separar as ditas células de esperma de acordo com as ditas características de DNA dos cromossomos.

TT. Método de Analisar Células Usando Óptica de Epi-iluminação e Foco de Ponto Elíptico

[001222] TT1. Método de analisar características de DNA de células em um fluxo de fluido, cada célula compreendendo uma região de DNA apresentando um comprimento na direção do fluxo de fluido, o dito método compreendendo:

[001223] o direcionamento de um feixe de radiação eletromagnética em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe, de modo que o feixe intersecte o dito fluxo de fluido;

[001224] a focalização do dito feixe de radiação eletromagnética no fluxo de fluido como um ponto geralmente elíptico apresentando um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos para a direção do escoamento do fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralelo à direção do escoamento do fluxo de fluido, a largura

do ponto de feixe sendo menor do que o comprimento da dita região de DNA, as ditas células sendo adaptadas para passarem através do dito ponto, resultando em uma emissão de radiação eletromagnética originárias das células dirigidas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira;

[001225] a detecção e a conversão das ditas emissões em sinais elétricos indicativos das ditas características de DNA; e

[001226] o processamento dos ditos sinais elétricos, incluindo a diferenciação entre sinais elétricos originários das emissões originárias da região de DNA de uma cabeça de esperma e sinais elétricos originários de emissões originárias de outras regiões da célula de esperma; e

[001227] a classificação das células de esperma de acordo com as ditas características de DNA.

[001228] TT2. Método de TT1, no qual as ditas células são células de esperma.

[001229] TT3. Método de TT1, que adicionalmente compreende a aplicação de uma força sobre as células no fluxo que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes que o fluxo passe através do dito feixe.

[001230] TT4. Método de TT1, que adicionalmente compreende a separação de gotículas das ditas células de acordo com as ditas características de DNA.

[001231] TT5. Método de TT1, que adicionalmente compreende a separação por fotodeterioração das ditas partículas de acordo com as ditas características de DNA.

[001232] TT6. Método de TT1, que adicionalmente compreende a separação de ligação de fluido das ditas partículas de acordo com as ditas características de DNA.

[001233] TT7. Método de analisar características de DNA dos cromossomos de células de esperma de animais em um fluxo de fluido

apresentando uma direção de fluxo, cada célula de esperma de animais apresentando uma cabeça com um núcleo compreendendo uma região de cromossomos localizada contendo pelo menos um cromossomo, o dito núcleo apresentando um comprimento na direção do fluxo de fluido, o dito método compreendendo:

[001234] focalizar um feixe de radiação eletromagnética no fluxo de fluido como um ponto geralmente elíptico apresentando um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos para a direção de fluxo de fluido com uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralelo à direção do escoamento do fluxo, a largura do ponto de feixe sendo menor que o comprimento do dito núcleo, as ditas células de esperma sendo adaptadas para passarem através do dito ponto resultando em uma emissão de radiação eletromagnética originárias das células de esperma, incluindo emissões das ditas regiões de cromossomos indicativas das características de cromossomos das regiões;

[001235] a detecção e a conversão de pelo menos parte das ditas emissões originárias das regiões de cromossomos em sinais elétricos indicativos das ditas características dos cromossomos;

[001236] o processamento dos ditos sinais elétricos, incluindo a identificação das ditas características dos cromossomos; e

[001237] a classificação das células de esperma de acordo com as ditas características dos cromossomos.

[001238] TT8. Método, de acordo com a reivindicação TT7, no qual as ditas características dos cromossomos são indicativas do sexo das células de esperma.

[001239] TT9. Método, de acordo com a reivindicação TT8, no qual as ditas células de esperma são células de esperma bovino.

[001240] TT10. Método, de acordo com a reivindicação TT8, no qual a dita região de cromossomos é localizada dentro de uma área do nú-

cleo que se estende em não mais do que cerca de 20% do comprimento do núcleo em cada lado de um centro longitudinal do núcleo.

[001241] TT11. Método, de acordo com a reivindicação TT10, no qual a dita região de cromossomos é localizada dentro de uma área do núcleo que se estende em não mais do que cerca de 10% - 15% do comprimento do núcleo em cada lado de um centro longitudinal do núcleo.

[001242] TT12. Método, de acordo com a reivindicação TT7, no qual os ditos sinais elétricos compreendem uma saída analógica de variação de tempo, adicionalmente compreendendo a amostragem sincrônica da saída analógica de variação de tempo e suprimindo uma saída incluindo informação digital que corresponde à dita saída analógica de variação de tempo, no qual a dita saída analógica de variação de tempo e a informação digital correspondente são indicativas das ditas características dos cromossomos, no qual o dito processamento compreende a análise da informação digital, e no qual a dita classificação compreende a classificação da informação digital analisada.

[001243] TT13. Método, de acordo com a reivindicação TT7, no qual a dita largura do ponto é menor do que cerca de 3,0 μm .

[001244] TT14. Método, de acordo com a reivindicação TT13, no qual o dito comprimento de ponto é maior do que cerca de 180 μm .

[001245] TT15. Método, de acordo com a reivindicação TT7, que adicionalmente compreende a aplicação de uma força sobre as células de esperma no fluxo que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes que o fluxo passe através do dito feixe.

[001246] TT16. Método, de acordo com a reivindicação TT7, que adicionalmente compreende a separação de gotículas das ditas células de esperma de acordo com as ditas características de DNA dos cromossomos.

[001247] TT17. Método, de acordo com a reivindicação TT7, que

adicionalmente compreende a separação por fotodeterioração das ditas células de esperma de acordo com as ditas características de DNA dos cromossomos.

[001248] TT18. Método, de acordo com a reivindicação TT7, que adicionalmente compreende a separação de ligação de fluido das células de esperma de acordo com as ditas características de DNA dos cromossomos.

UU. Separador de Espermatozoides Apresentando Apenas um Fotodetector

[001249] UU1. Aparelho para classificar e separar células de esperma de acordo com as características de DNA dos cromossomos das células, o dito aparelho compreendendo:

[001250] um sistema de bocal para dispensar um fluxo de fluido contendo as ditas células para uma primeira localização e para fazer com que o fluxo se rompa em gotículas em uma segunda localização, o dito sistema de bocal compreendendo um bocal apresentando uma superfície interna configurada para exercer uma força sobre as células que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes de alcançar a dita primeira localização;

[001251] um sistema óptico para direccionar um feixe de radiação eletromagnética para intersectar o fluxo de fluido na dita primeira localização, de modo que as células no fluxo passem através do dito feixe, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das células;

[001252] apenas um fotodetector para detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos; e

[001253] um sistema para classificar as células de acordo com as ditas características de DNA e para separar as ditas gotículas de acordo com a classificação das células contidas nas gotículas.

[001254] UU2. Aparelho de UU1, no qual o dito sistema óptico é um

sistema de epi-iluminação.

VV. Bocal de Orientação

[001255] VV1. Bocal para uso em um aparelho de citometria de fluxo para separar células de esperma de animais em um fluxo de fluido por meio do teor dos cromossomos, o dito bocal compreendendo:

[001256] um corpo de bocal apresentando uma superfície interna e um orifício através do qual o dito fluxo de fluido é adaptado para fluir;

[001257] a dita superfície interna do bocal compreendendo uma primeira, uma segunda e uma terceira regiões axialmente afuniladas para progressivamente acelerar a velocidade do dito fluxo de fluido em uma direção a jusante na direção do dito orifício de bocal, pelo menos duas das ditas regiões apresentando formas em seção transversal geralmente elípticas orientadas em diferentes direções para aplicar as forças torsionais ao dito fluxo de fluido que tende a trazer as células de esperma para uma orientação desejada.

[001258] VV2. Bocal de VV1, no qual a forma em seção transversal geralmente elíptica de uma de pelo menos duas ditas regiões é orientada em cerca de 90 graus com relação à forma em seção transversal da outra de pelo menos duas ditas regiões.

[001259] VV3. Bocal de VV2, no qual as ditas formas em seção transversal geralmente elípticas das primeira e segunda regiões são orientadas substancialmente na mesma direção para definirem uma primeira zona torsional, e no qual a primeira forma em seção transversal geralmente elíptica da terceira região, constituindo uma segunda zona torsional, é orientada em cerca de 90 graus com relação às primeiras formas em seção transversal geralmente elípticas das primeira e segunda regiões.

[001260] VV4. Bocal de VV3, no qual a primeira zona torsional apresenta um comprimento axial de 3,0-4,5 mm e a segunda zona torsional apresenta um comprimento axial de 3,5-5,0 mm.

[001261] VV5. Bocal de VV1, no qual a terceira região se afunila em um ângulo de 42-48 graus.

[001262] VV6. Bocal de VV1, no qual todas as ditas regiões apresentam formas em seção transversal geralmente elíptica.

[001263] VV7. Bocal de VV1, no qual o dito corpo de bocal apresenta uma superfície externa com um revestimento não-reflexivo na mesma.

[001264] VV8. Bocal de VV1, que adicionalmente compreende um suporte para montar o dito bocal em uma posição apontando para cima para direcionar o dito fluxo de fluido ao longo de uma trajetória ascendente.

[001265] VV9. Bocal, de acordo com a reivindicação VV8, no qual o dito corpo de bocal é girável no dito suporte em um eixo longitudinal do corpo.

WW. Método de Orientar Células de Esperma

[001266] WW1. Método de orientar células de esperma de animais em um aparelho de citometria de fluxo, o dito método compreendendo:

[001267] a introdução de um fluido contendo células de esperma em um fluxo de fluido;

[001268] o direcionamento do fluxo de fluido contendo as ditas células de esperma sob uma pressão na faixa de 137,5 – 275 kPa (20 a 40 psi) através de um bocal apresentando uma ou mais regiões afuniladas para acelerar a velocidade do dito fluxo de fluido em uma direção a jusante na direção de um orifício de bocal apresentando um diâmetro na faixa de 50-70 microns, uma ou mais das ditas regiões afuniladas apresentando uma forma em seção transversal geralmente elíptica para aplicar uma força torsional ao dito fluxo de fluido que tende a trazer as células para orientação desejada à medida que elas passam através do dito orifício em uma taxa na faixa de 30.000 a 50.000 células de esperma por segundo.

[001269] WW2. Método de WW1, no qual o dito bocal apresenta três

ou mais regiões afuniladas para progressivamente acelerar o fluxo de fluido na direção do orifício de bocal.

[001270] WW3. Método de WW2, no qual o dito bocal apresenta duas zonas torsionais definidas pelas superfícies internas do bocal nas ditas três ou mais regiões afuniladas.

[001271] WW4. Método de WW3, no qual o dito bocal apresente um eixo de fluxo através do dito orifício, e no qual pelo menos algumas das ditas superfícies de bocal internas apresentam formas geralmente elípticas que são giradas entre si em torno do dito eixo.

[001272] WW5. Método de WW1, que adicionalmente compreende o direcionamento do dito fluxo ao longo de uma trajetória ascendente não-vertical.

[001273] WW6. Método de WW1, que adicionalmente compreende a rotação do corpo, de bocal em um eixo longitudinal central do corpo enquanto do direcionamento do dito fluxo.

XX. Separador de Partículas Apresentando Bocal Apontando para Cima

[001274] XX1. Aparelho para separar partículas com o uso da citometria de fluxo, que compreende:

[001275] um sistema de bocal para dispensar um fluxo de fluido contendo as ditas partículas através de um orifício de bocal ao longo de uma trajetória ascendente não-vertical;

[001276] um sistema óptico para direcionar um feixe de radiação eletromagnética para intersectar o dito fluxo de fluido na dita primeira localização, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das partículas;

[001277] um fotodetector operável para detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos indicativos das ditas características de partícula;

[001278] um processador para processar os ditos sinais elétricos e

classificar as partículas de acordo com as ditas características; e
[001279] um sistema de separação para separar as ditas partículas de acordo com a classificação das partículas.

[001280] XX2. Aparelho de XX1, no qual o dito sistema de separação compreende um sistema de separação de gotículas.

[001281] XX3. Aparelho de XX1, no qual o dito sistema de separação compreende um sistema de separação por fotodeterioração.

[001282] XX4. Aparelho de XX1, no qual o dito sistema de separação compreende um sistema de separação por ligação de fluido.

[001283] XX5. Aparelho de XX1, no qual o dito sistema de bocal compreende um bocal que apresenta um revestimento não-reflexivo no mesmo.

[001284] XX6. Aparelho de XX1, no qual a dita trajetória ascendente no orifício de bocal está em um ângulo na faixa de 5-85 graus deslocado da horizontal.

[001285] XX7. Aparelho de XX1, no qual a dita trajetória ascendente no orifício de bocal está em um ângulo na faixa de 15-75 graus deslocado da horizontal.

[001286] XX8. Aparelho de XX1, no qual a dita trajetória ascendente está em um ângulo na faixa de 30-65 graus deslocado da horizontal.

[001287] XX9. Aparelho de XX1, no qual a dita trajetória ascendente no orifício de bocal está em um ângulo na faixa de 45-60 graus deslocado da horizontal.

YY. Método de Separar Partículas Usando o Bocal Apontando para Cima

[001288] YY1. Método de separar partículas com o uso da citometria de fluxo, que compreende:

[001289] a distribuição de um fluxo de fluido contendo as ditas partículas através de um orifício de bocal ao longo de uma trajetória ascendente não-vertical em uma primeira localização;

[001290] o direcionamento de um feixe de radiação eletromagnética para intersectar o dito fluxo de fluido na dita primeira localização, resultando em emissões de radiação eletromagnética originárias das partículas;

[001291] a detecção e a conversão de pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos indicativos das ditas características de partícula;

[001292] o processamento dos ditos sinais elétricos e a classificação das partículas de acordo com as ditas características; e

[001293] a separação das ditas partículas de acordo com a classificação das partículas.

[001294] YY2. Método de YY1, no qual a dita etapa de separação compreende a separação por meio do uso de um processo de separação de gotículas.

[001295] YY3. Método de YY1, no qual a dita etapa de separação compreende a separação por meio do uso de um processo de separação por ligação de fluido.

[001296] YY4. Método de YY1, no qual a dita etapa de separação compreende a separação por meio do uso de um processo de separação por ligação de fluido.

ZZ. Parâmetros de Processo

[001297] ZZ1. Método de separar uma população de células desejada originária de uma mistura de células com o uso de citometria de fluxo, a dita população apresentando uma características de luz detectável, o dito método compreendendo:

[001298] o direcionamento de um fluxo de fluido contendo as ditas células através de um orifício de bocal apresentando um diâmetro de cerca de 50 a 70 μm em uma pressão na faixa de cerca de 137,5 – 275 kPa (20 a 40 psi) e em uma taxa de células de cerca de 30.000 a 50.000 células por segundo;

[001299] a ruptura do fluxo de fluido em gotículas em uma frequência de cerca de 20 a 100 KHz; e

[001300] a separação das gotículas com o uso da citometria de fluxo para separar a dita população de células desejada originária da dita mistura de células.

[001301] ZZ2. Método de ZZ1, no qual as ditas células são células de esperma.

[001302] ZZ3. Método de ZZ2, no qual a dita população de células desejada contém células X vivas.

A.A.A. Método de Negócios

[001303] AAA1. Método de negociar, incluindo a manipulação de sêmen apresentando células no mesmo, o dito método compreendendo:

[001304] a obtenção de um suprimento de sêmen;

[001305] o uso de uma máquina programável para conduzir uma pluralidade de operações integradas de citometria de fluxo, as ditas operações compreendendo: (a) o recebimento do dito suprimento de sêmen; (b) a formação de múltiplos fluxos contendo as ditas células; e (c) a separação das ditas células em uma primeira população de células apresentando uma característica A e uma segunda população apresentando uma característica B; e

[001306] a distribuição das primeira e segunda populações para uso comercial.

[001307] AAA2. Método de AAA1, no qual as ditas células são células de esperma, e no qual a característica A é indicativa de uma célula de esperma X viva.

[001308] AAA3. Método de AAA2, no qual o sêmen é um sêmen bovino, e no qual a primeira população é vendida para uso em vacas artificialmente inseminadas.

[001309] AAA4. Método de AAA3, no qual a dita máquina programá-

vel é operável para conduzir as ditas operações em paralelo.

BBB. Método de Negócios

[001310] BBB1. Método de negociar, incluindo a manipulação de uma amostra de sêmen apresentando células no mesmo, o dito método compreendendo:

[001311] a obtenção de um suprimento de sêmen;

[001312] o uso de uma máquina programável para conduzir uma pluralidade de operações integradas de citometria de fluxo, as ditas operações compreendendo: (a) o recebimento do dito suprimento de sêmen; e (b) a separação das ditas células a partir de uma porção inicial do dito suprimento em diferentes populações, incluindo uma primeira população contendo células apresentando a característica A e uma segunda população contendo as células apresentando a característica B; e

[001313] a separação das ditas células originárias da porção remanescente do dito suprimento em diferentes grupos, incluindo um primeiro grupo contendo células apresentando a característica A e um segundo grupo contendo as células apresentando a característica B, apenas se as células inicialmente separadas originárias da porção inicial atenderem ou excederem um padrão preestabelecido.

[001314] BBB2. Método de BBB1, que adicionalmente compreende a distribuição da primeira ou da segunda população para uso comercial.

[001315] BBB3. Método de BBB1, no qual o padrão preestabelecido é uma taxa de recuperação mínima de células apresentando a característica A ou a característica B ou uma pureza mínima para pelo menos uma das populações.

[001316] BBB4. Método de BBB1, que adicionalmente compreende a condução da dita pluralidade de operações integradas de citometria de fluxo em paralelo.

CCC. Método de Negócios

[001317] CCC1. Método de negociar, incluindo a manipulação de uma amostra de sêmen apresentando células no mesmo, o dito método compreendendo:

[001318] a obtenção de um suprimento de sêmen;

[001319] o uso de uma máquina para se conduzir uma pluralidade de operações integradas de citometria de fluxo, as ditas operações compreendendo: (a) o recebimento do dito suprimento de sêmen; e (b) a separação das ditas células originárias de uma primeira porção do dito suprimento em diferentes populações, incluindo uma primeira população contendo células apresentando uma característica A e uma segunda população contendo células apresentando uma característica B, e a separação das ditas células originárias de uma segunda porção do dito suprimento em diferentes populações, incluindo uma primeira população contendo células apresentando uma característica A e uma segunda população contendo células apresentando uma característica B; e

[001320] a mistura de uma das populações da primeira porção com uma das populações da segunda porção para se obter uma população misturada.

[001321] CCC2. Método de CCC1, no qual a dita primeira população da primeira porção apresenta uma pureza inaceitável, no qual a primeira população da segunda porção apresenta uma pureza aceitável, e no qual a população misturada apresenta uma pureza aceitável.

DDD. Separação de Interferência de Gotículas com Epi-iluminação

[001322] DDD1. Sistema de interferência de gotículas para separar células de espermatozoides de acordo com as características de DNA dos cromossomos, que compreende:

[001323] um aparelho de citometria de fluxo para dispensar um fluxo de fluido contendo as ditas células em uma primeira localização e para fazer com que os segmentos de fluxo selecionados do fluxo de fluido

sejam atingidos por uma gotícula originária de um fluxo de fluido de interferência de gotícula em uma segunda localização, separando assim os segmentos selecionados e as células contidas nos mesmos do dito fluxo de fluido, o dito aparelho de citometria de fluxo sendo operável para classificar as células de acordo com as ditas características de DNA e para separar o segmentos de fluxo de acordo com a classificação das células contidas no segmentos de fluxo;

[001324] o dito aparelho de citometria de fluxo compreendendo um sistema óptico de epi-iluminação incluindo uma lente de focalização, o dito sistema óptico sendo operável para direcionar um feixe de laser através da dita lente de focalização em uma direção dianteira ao longo de um eixo de feixe que intersecta o fluxo de fluido na dita primeira localização, de modo que as ditas células passem através do feixe, resultando em emissões de radiação eletromagnética originária das células direcionadas ao longo do dito eixo de feixe em uma direção traseira.

[001325] DDD2. Sistema de DDD1, no qual o dito sistema óptico adicionalmente compreende um fotodetector no dito eixo de feixe na parte detrás da dita lente de focalização operável para detectar e converter pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos indicativos das ditas características de DNA.

[001326] DDD3. Sistema de DDD1, no qual as células são células de esperma e as características de DNA compreendem o teor de cromossomo de sexo das células de esperma.

[001327] DDD4. Sistema de DDD3, no qual o dito feixe é focalizado pelo dito sistema óptico como um ponto no fluxo de fluido na dita primeira localização, o dito ponto apresentando uma forma geralmente elíptica com um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos para a direção do escoamento do fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se

estende geralmente paralela à direção do escoamento do fluxo de fluido, a dita largura sendo menor que o comprimento da cabeça de uma célula de esperma que passa através do ponto de feixe.

[001328] DDD5. Sistema de DDD4, no qual a cabeça da dita célula de esperma inclui uma região de DNA que apresenta um comprimento na direção do escoamento do fluxo, e no qual a dita largura do ponto de feixe é menor do que o comprimento da dita região de DNA.

[001329] DDD6. Sistema de DDD1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende um bocal apresentando uma superfície interna configurada para exercer uma força sobre as células que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes da passagem através do dito feixe.

[001330] DDD7. Sistema de DDD6, no qual o dito bocal é girável em torno de um eixo longitudinal do bocal para ajustar a dita orientação de célula desejada com relação ao eixo de feixe.

[001331] DDD8. Sistema de DDD1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo operáveis para analisar os múltiplos fluxos de fluido simultaneamente, cada unidade de citometria de fluxo compreendendo o dito sistema óptico de epi-iluminação.

[001332] DDD9. Sistema de DDD1, no qual o dito sistema óptico inclui apenas um fotodetector para detectar as ditas emissões.

[001333] DDD10. Sistema de DDD1, no qual o dito aparelho de citometria de fluxo compreende um bocal apresentando um orifício de bocal, e um tubo capilar que se estende do orifício através do qual o dito fluxo de fluido é dispensado na dita primeira localização.

[001334] DDD11. Sistema de DDD10, no qual a dita primeira localização está dentro do dito tubo capilar.

[001335] DDD12. Sistema de DDD11, no qual o dito sistema óptico é opticamente acoplado ao dito tubo capilar pra transmissão do feixe no

fluxo que flui através do tubo.

A'. Criopreservação.

[001336] (acrescentar crioprotetor e depois resfriar)

[001337] A1'. Método de criopreservar células de esperma compreendendo as etapas de:

[001338] acrescentar um crioprotetor a uma quantidade de células de esperma;

[001339] resfriar a dita quantidade de células de esperma e o dito crioprotetor a uma temperatura de conservação em uma faixa de cerca de 0- 8°C;

[001340] manter as ditas células de esperma e o dito crioprotetor substancialmente na dita temperatura de conservação por um período de menos de cerca de 60 minutos; e

[001341] super-resfriar a dita quantidade de células de esperma a uma temperatura de -40°C.

[001342] A2'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual a dita temperatura de conservação está na faixa de cerca de 2 - 6°C.

[001343] A3'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual a dita temperatura de conservação está na faixa de cerca de 4 - 5°C.

[001344] A4'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual a etapa de acrescentar um crioprotetor compreende o acréscimo de glicerol.

[001345] A5'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual a etapa de acrescentar um crioprotetor compreende o acréscimo de cerca de 6% de glicerol (v/v).

[001346] A6'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual o dito período de conservação é menor do que cerca de 40 minutos.

[001347] A7'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual o dito período de conservação é de cerca de 30 minutos.

[001348] A8'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual a

etapa de resfriamento compreende o resfriamento da dita quantidade de espermatozoides em uma taxa de resfriamento substancialmente constante.

[001349] A9'. Método, de acordo com a reivindicação A8', no qual a taxa de resfriamento é selecionada de modo que a dita quantidade de células de espermatozoide seja resfriada a partir de uma temperatura acima de uma temperatura de transição de vidro abaixo da qual as células de espermatozoide são submetidas a danos originários de choque frio à temperatura de conservação em cerca de 90 minutos.

[001350] A10'. Método, de acordo com a reivindicação A8', no qual a taxa de resfriamento substancialmente constante está na faixa de cerca de 0,1-0,3°C por minuto.

[001351] A11'. Método, de acordo com a reivindicação A8', no qual a taxa de resfriamento substancialmente constante está na faixa de cerca de 0,15-0,25°C por minuto.

[001352] A12'. Método, de acordo com a reivindicação A11', no qual o dito período de conservação é menor do que cerca de 40 minutos de duração.

[001353] A13'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual a etapa de resfriamento é executada com o uso de um congelador programável para resfriar as células de espermatozoide em uma taxa programada.

[001354] A14'. Método, de acordo com a reivindicação A13', no qual o dito período de conservação é menor que 40 minutos de duração.

[001355] A15'. Método, de acordo com a reivindicação A14', no qual a taxa de resfriamento programada compreende uma taxa de resfriamento constante de cerca de 0,2°C por minuto.

[001356] A16'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual a etapa de super-resfriamento da dita quantidade de espermatozoides compreende o resfriamento das células de espermatozoide em uma primeira taxa de

resfriamento em uma temperatura que se aproxima de uma zona de temperatura crítica na qual a formação de cristal de gelo e mudanças na pressão osmótica danificam em células de esperma e o resfriamento do esperma em uma segunda taxa de resfriamento mais rápida do que a dita primeira taxa de resfriamento para uma temperatura que é menor que cerca de -30°C .

[001357] A17'. Método, de acordo com a reivindicação A16', no qual a dita primeira taxa de resfriamento está na faixa de cerca de 1 - 5°C por minuto.

[001358] A18'. Método, de acordo com a reivindicação A16', no qual a dita primeira taxa de resfriamento está na faixa de cerca de 2 - 4°C por minuto.

[001359] A19'. Método, de acordo com a reivindicação A16', no qual a dita primeira taxa de resfriamento é de cerca de 3°C por minuto.

[001360] A20'. Método, de acordo com a reivindicação A16', no qual a dita segunda taxa de resfriamento está na faixa de cerca de 8 - 12°C por minuto.

[001361] A21'. Método, de acordo com a reivindicação A16', no qual a dita segunda taxa de resfriamento é de cerca de 10°C por minuto.

[001362] A22'. Método, de acordo com a reivindicação A16', no qual as células de esperma são resfriadas a uma temperatura de cerca de -15°C na dita primeira taxa de resfriamento.

[001363] A23'. Método, de acordo com a reivindicação A22', no qual as células de esperma são resfriadas de cerca de -15°C a uma temperatura de cerca de -80°C na dita segunda taxa de resfriamento.

[001364] A24'. Método, de acordo com a reivindicação A16', no qual as células de esperma são resfriadas a uma temperatura de cerca de -18°C na dita primeira taxa de resfriamento.

[001365] A25'. Método, de acordo com a reivindicação A24', no qual as células de esperma são resfriadas de cerca de -18°C a uma tempe-

ratura de cerca de -80° na dita segunda taxa de resfriamento.

[001366] A26'. Método, de acordo com a reivindicação A16', no qual as células de esperma são resfriadas na dita primeira taxa e na dita segunda taxa em um congelador programável.

[001367] A27'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual a etapa de acrescentar um crioprotetor a uma quantidade de células de esperma compreende o acréscimo de um crioprotetor a um fluido de revestimento e o uso do dito fluido de revestimento em um citômetro de fluxo que analisa as células de esperma.

[001368] A28'. Método, de acordo com a reivindicação A27', que adicionalmente compreende a etapa de usar o dito citômetro de fluxo para separar as ditas células de esperma em uma população de células de esperma apresentando uma característica desejada para se obter a dita quantidade de células de esperma.

[001369] A29'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual as etapas de resfriar a dita quantidade de espermas, mantendo as ditas células de esperma na temperatura de conservação, e super-resfriar a dita quantidade de células de esperma são todas completadas em menos de 220 minutos.

[001370] A30'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual as etapas de resfriar a dita quantidade de espermas, mantendo as ditas células de esperma na temperatura de conservação, e de super-resfriar a dita quantidade de células de esperma são todas completadas em menos de cerca de 190 minutos.

[001371] A31'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual as etapas de resfriar a dita quantidade de espermas, mantendo as ditas células de esperma na temperatura de conservação, e de super-resfriar a dita quantidade de células de esperma são todas completadas em menos de cerca de 150 minutos.

[001372] A32'. Método, de acordo com a reivindicação A1', que adi-

cionalmente compreende a etapa de carregar a dita quantidade de células de esperma em um canudo de inseminação artificial depois que o crioprotetor foi acrescentado à dita quantidade de células de esperma.

[001373] A33'. Método, de acordo com a reivindicação A1', no qual a dita quantidade de células de esperma constitui uma primeira quantidade de células de esperma, o método adicionalmente compreendendo as etapas de se obter uma população separada de células de esperma compreendendo mais de 500×10^6 células de esperma originárias de um citômetro de fluxo, para assim se obter uma pluralidade de quantidades de células de esperma incluindo a dita primeira quantidade de células de esperma, de carregar cada da dita pluralidade de quantidades de células de esperma em um canudo de inseminação artificial, e de executar as etapas de resfriamento, manutenção, e super-resfriamento em cada da dita pluralidade de quantidades de células de esperma em um processo de lote para se obter um lote de canudos de inseminação artificial contendo células de esperma criopreservadas.

[001374] A34'. Método, de acordo com a reivindicação A33', no qual a dita população separada de células de esperma compreende mais de 800×10^6 células de esperma.

[001375] A35'. Método, de acordo com a reivindicação A33', no qual as etapas do método são completadas em menos de cerca de 240 minutos.

[001376] A36'. Método, de acordo com a reivindicação A33', no qual as etapas do método são completadas em menos de 210 minutos.

[001377] A37'. Método, de acordo com a reivindicação A33', no qual as etapas do método são completadas em menos e cerca de 170 minutos.

[001378] A38'. Método, de acordo com a reivindicação A1', que adicionalmente compreende a etapa de tingir a dita quantidade de células

de esperma com um corante fluorescente seletivo de DNA antes da etapa de resfriamento.

[001379] A39'. Método, de acordo com a reivindicação A38', no qual o dito corante seletivo de DNA compreende o corante Hoechst 33342.

[001380] A40'. Método, de acordo com a reivindicação A39', no qual a dita etapa de tingir a dita quantidade de espermatozoides compreende a etapa de incubar a dita quantidade de células de esperma por um período de tempo em uma solução compreendendo corante Hoechst 33342 em uma temperatura que excede a 40°C.

[001381] separação por temperatura fria

[001382] A41'. Método de criopreservar célula de esperma compreendendo as etapas de:

[001383] resfriar uma quantidade de células de esperma em uma temperatura de conservação na faixa de cerca de 0-8°C;

[001384] acrescentar um crioprotetor à dita quantidade de células de esperma; e

[001385] manter as ditas células de esperma e o dito crioprotetor substancialmente na dita temperatura de conservação por um período menor que 60 minutos.

[001386] A42'. Método, de acordo com a reivindicação A41', no qual o dito período está na faixa de cerca de 30 minutos a menos de 60 minutos.

[001387] A43'. Método, de acordo com a reivindicação A41', no qual a etapa de acrescentar um crioprotetor compreende o acréscimo de glicerol.

[001388] A44'. Método, de acordo com a reivindicação A41', no qual a etapa de acrescentar um crioprotetor compreende o acréscimo de cerca de 7% de glicerol (v/v).

B'. Bocal com Defletor

[001389] B1'. Bocal para uso em um aparelho de citometria de fluxo

para analisar partículas em um fluxo de fluido, o dito fluxo de fluido compreendendo um fluido de revestimento que circunda um fluxo de núcleo contendo as ditas partículas, o dito bocal compreendendo:

[001390] um bocal apresentando uma superfície interna que define um percurso de fluxo para o dito fluxo de fluido, e um orifício para a saída do fluxo de fluido a partir do bocal; e

[001391] um defletor no bocal posicionado no dito percurso de fluxo a montante do dito orifício para defletir o fluxo de fluido à medida que ele se move ao longo do dito percurso de fluxo,

[001392] o defletor e a superfície interna do bocal são configurados para orientarem as partículas em uma orientação desejada à medida que elas saem do orifício.

[001393] B2'. Bocal de acordo com a reivindicação B1I, no qual o dito defletor é configurado para defletir o dito fluxo de núcleo longe de um eixo longitudinal central do bocal e na direção da dita superfície interna do bocal.

[001394] B3'. Bocal, de acordo com a reivindicação B1', no qual o dito bocal apresenta uma primeira área de fluxo em seção transversal a montante do dito defletor e uma segunda área de fluxo em seção transversal diferente da dita primeira área de fluxo em seção transversal no defletor.

[001395] B4'. Bocal, de acordo com a reivindicação B3', no qual a dita segunda área de fluxo em seção transversal é menor do que a dita primeira área de fluxo em seção transversal.

[001396] B5'. Bocal, de acordo com a reivindicação B3', no qual as ditas primeira e segunda áreas de fluxo em seção transversal apresentem formas diferentes.

[001397] B6'. Bocal, de acordo com a reivindicação B5', no qual a dita segunda área de fluxo em seção transversal é geralmente semicilíndrica.

[001398] B7'. Bocal, de acordo com a reivindicação B1', no qual a dita superfície interna do bocal é formada para definir pelo menos duas regiões axialmente afuniladas a jusante do dito defletor para progressivamente acelerar a velocidade do fluxo de fluido em uma direção a jusante na direção do orifício de bocal.

[001399] B8'. Bocal, de acordo com a reivindicação B7', no qual o dito defletor é configurado para defletir o dito fluxo de núcleo na direção de uma porção da dita superfície interna do bocal definindo pelo menos uma das ditas duas regiões axialmente afuniladas.

[001400] B9'. Bocal, de acordo com a reivindicação B8', no qual pelo menos as duas ditas regiões axialmente afuniladas apresentam formas em seção transversal geralmente elípticas orientadas em direções diferentes para a aplicação de forças torsionais ao dito fluxo de fluido que tendem a trazer as partículas para a dita orientação desejada.

[001401] B10'. Bocal, de acordo com a reivindicação B9', no qual a dita forma em seção transversal geralmente elíptica de uma de pelo menos duas regiões é orientada em cerca de 90 graus com relação à forma em seção transversal geralmente elíptica da outra das ditas pelo menos duas regiões.

[001402] B11'. Bocal, de acordo com a reivindicação B1', no qual o bocal apresenta uma superfície externa com um revestimento não-reflexivo na mesma.

[001403] B12'. Bocal, de acordo com a reivindicação B1', que adicionalmente compreende um suporte para a montagem do dito bocal em uma posição que aponta para cima para direcionar o dito fluxo de fluido ao longo de uma trajetória ascendente.

[001404] B13'. Bocal, de acordo com a reivindicação B13', no qual o bocal é girável no dito suporte em torno de um eixo longitudinal do bocal.

[001405] B14'. Bocal, de acordo com a reivindicação B1', no qual o

dito defletor compreende um membro defletor para defletir o dito fluxo de fluido e um suporte para deter o dito membro defletor em posição fixa no dito bocal.

[001406] B15'. Bocal, de acordo com a reivindicação B14', no qual o dito membro defletor compreende uma placa defletora.

[001407] B16'. Bocal, de acordo com a reivindicação B15', no qual a dita placa defletora apresenta uma primeira perna que se estende geralmente no sentido transversal com relação ao dito fluxo de fluido e uma segunda perna que se estende geralmente na direção do dito fluxo de fluido.

[001408] B17'. Bocal, de acordo com a reivindicação B15', no qual o dito suporte compreende um invólucro geralmente cilíndrico que detém a dita placa defletora posicionada no dito bocal.

[001409] B18'. Bocal, de acordo com a reivindicação B16', no qual a dita superfície interna do bocal apresenta uma região de seção transversal geralmente elíptica a jusante do dito defletor, e no qual as ditas primeira e segunda pernas do membro defletor intersectam ao longo de uma linha que é substancialmente paralela com um eixo principal da dita seção transversal geralmente elíptica.

[001410] B19'. Bocal, de acordo com a reivindicação B16', no qual a dita superfície interna do bocal apresenta uma região de seção transversal geralmente elíptica a jusante do dito defletor, e no qual as ditas primeira e segunda pernas do membro defletor se intersectam ao longo de uma linha que é substancialmente perpendicular a um eixo principal da dita seção transversal geralmente elíptica.

[001411] B20'. Bocal, de acordo com a reivindicação B15', no qual a placa defletora é geralmente perpendicular a um eixo longitudinal do bocal.

[001412] B21'. Bocal, de acordo com a reivindicação B20', no qual a dita placa defletora apresenta uma forma semicircular.

[001413] B22'. Bocal, de acordo com a reivindicação B20', no qual a placa defletora apresenta uma forma semi-elíptica.

[001414] B23'. Bocal, de acordo com a reivindicação B20', no qual a superfície interna do bocal é formada para definir uma projeção, e o suporte compreende uma vedação de anel em O capaz de pressionar a placa defletora contra a projeção para deter a placa defletora em uma posição desejada.

[001415] B24'. Método, de acordo com a reivindicação B20', no qual o suporte de defletor detém a placa defletora em uma posição na qual a placa defletora interseca o eixo longitudinal do bocal.

[001416] B25'. Bocal de B1', no qual as ditas partículas compreendem células de esperma.

C. Bocal com Defletor (Método)

[001417] C1'. Método de orientar partículas em um aparelho de citometria de fluxo, o dito método compreendendo:

[001418] um fluxo de fluido apresentando um fluxo de núcleo de fluido de amostra contendo as ditas partículas e um fluxo de revestimento de fluido de revestimento circundando o fluxo de núcleo através de um bocal apresentando uma superfície interna que geralmente se afunila de uma porção a montante do bocal para um orifício na extremidade a jusante do bocal; e

[001419] a deflexão do fluxo de núcleo à medida que ele flui através do bocal para submeter as partículas no fluxo de núcleo às forças hidrodinâmicas que tendem a fazer com que as partículas assumam uma orientação desejada.

[001420] C2'. Método, de acordo com a reivindicação C1', no qual o bocal apresenta um eixo longitudinal e a etapa de defletir o fluxo de núcleo compreende a deflexão do fluxo de núcleo longe do eixo longitudinal na direção da dita superfície interna.

[001421] C3'. Método, de acordo com a reivindicação C1', no qual o

bocal apresenta um eixo longitudinal e a etapa de defletir o percurso do fluxo de núcleo compreende a deflexão do fluxo de núcleo de um percurso que geralmente coincide com o eixo longitudinal para um percurso defletido, pelo menos uma porção do percurso defletido sendo deslocada do eixo longitudinal do bocal.

[001422] C4'. Método, de acordo com a reivindicação C1', no qual o bocal apresenta um eixo longitudinal, o método adicionalmente compreendendo a introdução do fluxo de núcleo no fluido de revestimento em uma localização que é deslocada do eixo longitudinal.

[001423] C5'. Método, de acordo com a reivindicação C1', no qual a etapa de deflexão compreende o uso de um defletor para defletir o fluxo de núcleo.

[001424] C6'. Método, de acordo com a reivindicação C1', no qual a etapa de deflexão compreende o uso de uma placa defletora para defletir o fluxo de núcleo e o uso de um suporte de defletor para deter a placa defletora em posição no bocal.

[001425] C7'. Método, de acordo com a reivindicação C6', no qual a placa defletora intersecta o eixo longitudinal do bocal.

[001426] C8'. Método, de acordo com a reivindicação C1', no qual o bocal apresenta uma superfície interna que é formada para definir pelo menos uma zona torsional para submeter as partículas às forças de orientação hidrodinâmicas.

[001427] C9'. Método, de acordo com a reivindicação C8', no qual pelo menos uma zona torsional compreende uma região afunilada do bocal apresentando uma seção transversal geralmente elíptica.

[001428] C10'. Método, de acordo com a reivindicação C8', no qual a dita superfície interna é formada para definir múltiplas zonas torsionais.

[001429] C11'. Método, de acordo com a reivindicação C10', no qual cada uma das ditas múltiplas zonas torsionais compreende uma região

afunilada do bocal apresentando uma seção transversal geralmente elíptica.

[001430] C12'. Método, de acordo com a reivindicação C11', no qual a seção transversal geralmente elíptica para uma primeira das múltiplas zonas torsionais é orientada em uma direção diferente da seção transversal geralmente elíptica para uma segunda das múltiplas zonas torsionais.

[001431] C13'. Método, de acordo com a reivindicação C1', no qual a etapa de defletir o fluxo de núcleo compreende o uso de um defletor para defletir o fluxo de núcleo, o método adicionalmente compreendendo a etapa de fazer com que o fluxo de fluido flua através de uma primeira área de fluxo em seção transversal do que em uma segunda área de fluxo em seção transversal a jusante da primeira área de fluxo em seção transversal, onde as primeira e segunda áreas de fluxo em seção transversal apresentam formas diferentes.

[001432] C14'. Método, de acordo com a reivindicação C15', no qual a segunda área de fluxo em seção transversal é menor que a primeira área de fluxo em seção transversal.

D'. Bocal com Agulha de Injeção Assimétrica (Aparelho)

[001433] D1'. Sistema de bocal para uso em um citômetro de fluxo para analisar partículas em um fluxo de fluido, o dito fluxo de fluido compreendendo um fluido de revestimento que circunda um fluxo de núcleo contendo as ditas partículas, o dito sistema de bocal compreendendo:

[001434] um bocal apresentando um eixo longitudinal, uma superfície interna definindo um percurso de fluxo para o dito fluxo de fluido, e um orifício na extremidade a jusante do bocal para a saída do fluxo de fluido do bocal, a dita superfície interna sendo formada para definir pelo menos uma zona torsional que compreende uma região axialmente afunilada apresentando uma seção transversal geralmente elíptica pa-

ra orientar as ditas partículas em uma orientação desejada à medida que o fluxo de fluido flui através da zona torsional na direção do orifício; e

[001435] um conduto de um fonte de partículas para o bocal, o dito conduto sendo posicionado para introduzir o dito fluxo de núcleo no bocal em uma localização que é deslocada com relação ao eixo longitudinal do bocal.

[001436] D2'. Sistema de bocal, de acordo com a reivindicação D1', no qual a dita localização está a montante a partir de pelo menos uma dita zona torsional.

[001437] D3'. Sistema de bocal, de acordo com a reivindicação D1', no qual pelo menos uma zona torsional constitui uma primeira zona torsional, o dito bocal adicionalmente compreendendo uma segunda zona torsional.

[001438] D4'. Sistema de bocal, de acordo com a reivindicação D3', no qual a dita localização está a montante a partir da primeira zona torsional e pelo menos de uma porção da segunda zona torsional.

[001439] D5'. Sistema de bocal, de acordo com a reivindicação D3', no qual a segunda zona torsional compreende uma região axialmente afunilada do bocal apresentando uma seção transversal geralmente elíptica.

[001440] D6'. Sistema de bocal, de acordo com a reivindicação D5', no qual o eixo principal da seção transversal geralmente elíptica da primeira zona torsional é orientado em uma direção diferente do eixo principal da seção transversal geralmente elíptica da segunda zona torsional.

[001441] D7'. Sistema de bocal, de acordo com a reivindicação D6', no qual a seção transversal geralmente elíptica da primeira zona torsional é orientada em um ângulo de cerca de 90 graus com relação à seção transversal geralmente elíptica da segunda zona torsional.

[001442] D8'. Sistema de bocal, de acordo com a reivindicação D7', no qual a dita localização está a montante da primeira zona torsional e pelo menos de uma porção da segunda zona torsional.

E'. Introdução de Amostra Assimétrica (Método)

[001443] E1'. Método de orientar partículas em um citômetro de fluxo, que compreende:

[001444] o fluxo de um fluido de revestimento através de um bocal apresentando um eixo longitudinal e pelo menos uma zona torsional compreendendo uma região axialmente afunilada do bocal apresentando uma seção transversal geralmente elíptica; e

[001445] a introdução de um fluxo de fluido de núcleo contendo partículas no fluxo de fluido de revestimento em uma localização que é deslocada do dito eixo longitudinal para o escoamento do fluxo de fluido de revestimento e do fluxo de fluido de núcleo através de pelo menos uma zona torsional.

[001446] E2'. Método, de acordo com a reivindicação E1, no qual a etapa de ocasionar o fluxo de fluido através de pelo menos uma zona torsional compreende o escoamento do fluxo de núcleo ao longo de um percurso de fluxo, uma porção do dito percurso de fluxo sendo deslocada do eixo longitudinal do bocal, e de submeter as ditas partículas às forças de orientação hidrodinâmicas geradas pela dita zona torsional enquanto as ditas partículas estão se movendo ao longo da dita porção de deslocamento do percurso de fluxo.

[001447] E3'. Método, de acordo com a reivindicação E1, no qual pelo menos uma dita zona torsional constitui uma primeira zona torsional, o método adicionalmente compreendendo a etapa de fazer com que o fluxo de fluido de revestimento e o fluxo de fluido de núcleo fluam através de uma segunda zona torsional para orientar as partículas em uma orientação desejada.

[001448] E4'. Método, de acordo com a reivindicação E3, no qual a

dita segunda zona torsional compreende uma região afunilada no bocal apresentando uma área em seção transversal geralmente elíptica.

[001449] E5'. Método, de acordo com a reivindicação E4, no qual o eixo principal da área em seção transversal geralmente elíptica da primeira zona torsional é orientado em uma direção diferente do eixo principal da área em seção transversal geralmente elíptica da segunda zona torsional.

[001450] E6'. Método, de acordo com a reivindicação E4, no qual o eixo principal da área em seção transversal geralmente elíptica da primeira zona torsional é perpendicular ao eixo principal da área em seção transversal geralmente elíptica da segunda zona torsional.

F'. Concentração de Espermas Separados por Centrifugação Secundária

[001451] F1'. Método de processar células de esperma de animais, que compreende as etapas de:

[001452] coletar células de esperma de um animal macho;

[001453] separar as células de esperma em uma das múltiplas populações de células de esperma com base em uma ou mais das características de DNA específicas;

[001454] obter uma quantidade de células de esperma apresentando uma característica de DNA de uma das ditas múltiplas populações de células de esperma, a dita quantidade de células de esperma sendo contida em um volume de fluido de coleta;

[001455] submeter o dito volume de fluido de coleta a um primeiro processo de centrifugação para formar uma primeira pélete de células de esperma e um sobrenadante sobreposto à primeira pélete;

[001456] separar a primeira pélete do sobrenadante;

[001457] submeter o sobrenadante à centrifugação adicional para formar uma segunda pélete de células de esperma que permaneceu no sobrenadante depois da primeira centrifugação; e

[001458] acrescentar um volume de fluido de ressuspensão às primeira e segunda péletes para se obter uma suspensão de células de esperma apresentando a característica de DNA desejada, a quantidade do dito volume de fluido de ressuspensão sendo selecionada para resultar em uma concentração desejada de células de esperma na suspensão.

[001459] F2'. Método, de acordo com a reivindicação F1', no qual o primeiro processo de centrifugação compreende a centrifugação em uma velocidade suficiente para gerar uma força g na faixa de 550-800g.

[001460] F3'. Método, de acordo com a reivindicação F2', no qual o primeiro processo de centrifugação compreende a centrifugação do dito volume de fluido de coleta na dita velocidade por um período na faixa de 7 - 10 minutos.

[001461] F4'. Método, de acordo com a reivindicação F1', no qual uma dita ou mais características de DNA específicas compreendem ou não um cromossomo de sexo X ou Y em uma célula de esperma.

[001462] F5'. Método, de acordo com a reivindicação F1', que adicionalmente compreende a obtenção de uma pluralidade de quantidades de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada e a distribuição da dita pluralidade de quantidades de células de esperma para os criadores de animais através de um sistema de distribuição comercial.

G'. Filtração com baixa pressão

[001463] G1'. Método de processar células de esperma de animais, que compreende as etapas de:

[001464] coletar células de esperma de um animal macho;

[001465] separar as células de esperma para se obter uma quantidade de células de esperma apresentando uma característica desejada, a dita quantidade de células de esperma estando contida em um

primeiro volume de fluido apresentando uma primeira concentração de células de esperma no mesmo; e

[001466] a submissão das células de esperma a uma etapa de concentração na qual a concentração das ditas células de esperma é aumentada para uma segunda concentração maior do que a dita primeira concentração,

[001467] onde a dita etapa de concentração compreende o escoamento de pelo menos uma porção do primeiro volume de fluido através de um primeiro filtro em um diferencial de pressão através do primeiro filtro de menos de cerca de 68 kPa (20 polegadas de mercúrio), o dito filtro apresentando poros de filtro suficientemente pequenos para inibir a passagem das ditas células de esperma através dos mesmos, e a retenção de um segundo volume de fluido não-filtrado contendo as ditas células de esperma.

[001468] G2'. Método, de acordo com a reivindicação G1', no qual o diferencial de pressão através do filtro durante o dito escoamento é substancialmente constante.

[001469] G3'. Método, de acordo com a reivindicação G1', que adicionalmente compreende a etapa de intermitentemente reduzir o diferencial de pressão através do filtro por um período e depois substancialmente restaurar o diferencial de pressão.

[001470] G4'. Método, de acordo com a reivindicação G3', no qual a etapa de reduzir o diferencial de pressão compreende a etapa de reduzir o diferencial de pressão a cerca de zero.

[001471] G5'. Método, de acordo com a reivindicação G1', no qual os poros do filtro apresentam um tamanho na faixa de cerca de 0,2 - 1,0 microns.

[001472] G6'. Método, de acordo com a reivindicação G1', no qual cerca de 80%-90% do dito primeiro volume de fluido flui através do dito primeiro filtro.

[001473] G7'. Método, de acordo com a reivindicação G1', no qual o dito segundo volume de fluido não-filtrado é suficiente para impedir a aglutinação das células de esperma no dito primeiro filtro.

[001474] G8'. Método, de acordo com a reivindicação G1', que adicionalmente compreende o escoamento de pelo menos uma porção do dito segundo volume de fluido não-filtrado através de um segundo filtro apresentando poros de filtro suficientemente pequenos para inibir a passagem das ditas células de esperma através dos mesmos, a retenção de um terceiro volume de fluido não-filtrado contendo as ditas células de esperma, e a lavagem do dito segundo filtro com um fluido de suspensão para remover as células de esperma do segundo filtro para adição ao dito terceiro volume para chegar na dita segunda concentração.

[001475] G9'. Método, de acordo com a reivindicação G8', no qual cerca de 80% do segundo volume de fluido não-filtrado fluem através do dito segundo filtro.

[001476] G10'. Método, de acordo com a reivindicação G8', no qual o dito terceiro volume de fluido não-filtrado é suficiente para impedir a aglutinação das células de esperma no dito segundo filtro.

[001477] G11'. Método, de acordo com a reivindicação G8', no qual o dito segundo filtro é um filtro fino apresentando uma espessura na faixa de cerca de 50 - 500 microns.

[001478] G12'. Método, de acordo com a reivindicação G8', no qual o dito segundo filtro é um filtro fino que apresenta uma espessura na faixa de cerca de 75 - 250 microns.

[001479] G13'. Método, de acordo com a reivindicação G8', no qual o dito segundo filtro é um filtro fino que apresenta uma espessura na faixa de cerca de 100 - 150 microns.

[001480] G14'. Método, de acordo com a reivindicação G1', no qual o dito primeiro filtro é um filtro fino que apresenta uma espessura na fai-

xa de cerca de 50 - 500 microns.

[001481] G15'. Método, de acordo com a reivindicação G1', no qual o dito primeiro filtro é um filtro fino que apresenta uma espessura na faixa de cerca de 75 - 250 microns.

[001482] G16'. Método, de acordo com a reivindicação G1', no qual o dito primeiro filtro é um filtro fino que apresenta uma espessura na faixa de cerca de 100 - 150 microns.

H'. Controle de temperatura total (Tingimento de Alta Temperatura).

[001483] H1'. Método de processar células de esperma compreendendo as etapas de:

[001484] coletar uma amostra de sêmen contendo as células de esperma de um animal macho;

[001485] transportar a amostra de sêmen para uma instalação de processamento de esperma;

[001486] conduzir uma verificação de controle de qualidade inicial no sêmen;

[001487] tingir as células de esperma na dita amostra de sêmen com um corante fluorescente seletivo de DNA que é seletivamente ligado ao DNA nas células de esperma com a exposição das ditas células de esperma a um corante fluorescente seletivo de DNA para formar uma mistura de tingimento, e a submissão da mistura de tingimento a uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C;

[001488] usar de um citômetro de fluxo para separar as células de esperma com base em uma característica de DNA específica;

[001489] obter de uma quantidade de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada suspensa em um volume de fluido;

[001490] ajustar da concentração de células de esperma na dita suspensão com a execução de um processo de concentração para alcan-

çar uma concentração desejada; e

[001491] super-resfriar a dita quantidade de células de esperma.

[001492] H2'. Método, de acordo com a reivindicação H1', que adicionalmente compreende a manutenção da temperatura das células de esperma a partir do momento em que elas são coletadas até o início da etapa de tingimento em temperatura na faixa de cerca de 20-37°C e o isolamento das células de esperma das flutuações de temperatura durante esse tempo.

[001493] H3'. Método, de acordo com a reivindicação H2', no qual a etapa de isolar as células de esperma compreende a manutenção da amostra de sêmen em um recipiente isolado durante o transporte para a instalação de processamento.

[001494] H4'. Método, de acordo com a reivindicação H1', que adicionalmente compreende a etapa de colocar as células de esperma tingidas em um ambiente que apresenta uma temperatura na faixa de cerca de 18 - 25°C antes que elas sejam introduzidas no dito citômetro de fluxo para resfriar as células de esperma a partir da temperatura na qual elas são obtidas durante a etapa de tingimento antes do início da etapa de separação.

[001495] H5'. Método, de acordo com a reivindicação H1', no qual a etapa de super-resfriamento compreende o resfriamento das células de esperma a partir de uma temperatura que excede 20°C a uma temperatura na faixa de cerca de 0 - 8°C, e o acréscimo de uma fonte de proteína e crioprotetor às ditas células de esperma antes que a temperatura das células de esperma tenha sido resfriada para abaixo de 20°C.

[001496] H6'. Método, de acordo com a reivindicação H5', que adicionalmente compreende o uso de um congelador programável para: (a) resfriar as células de esperma a uma temperatura de conservação na faixa de cerca de 0 - 8°C; (b) manter o esperma na dita temperatura de

conservação por um período menor do que cerca de 60 minutos para permitir que as células de esperma sejam substancialmente equilibradas com o crioprotetor; (c) resfriar o esperma em uma primeira taxa de resfriamento a uma temperatura que se aproxima de uma zona de temperatura crítica na qual a formação de cristal de gelo e mudanças na pressão osmótica danificam as células de esperma; e (d) resfriar as células de esperma através da dita zona de temperatura crítica em uma segunda taxa de resfriamento mais rápida do que a primeira taxa de resfriamento.

[001497] H7'. Método, de acordo com a reivindicação H6', que adicionalmente compreende o resfriamento das células de esperma a partir da dita temperatura de conservação para cerca de -15°C na dita primeira taxa de resfriamento.

[001498] H8'. Método, de acordo com a reivindicação H7', que adicionalmente compreende o resfriamento das células de esperma de cerca de -18°C a pelo menos cerca de -30°C na dita segunda taxa de resfriamento.

[001499] H9'. Método, de acordo com a reivindicação H6', que adicionalmente compreende o resfriamento das células de esperma da dita temperatura de conservação a cerca de -18°C na dita primeira taxa de resfriamento.

[001500] H10'. Método, de acordo com a reivindicação H6', que adicionalmente compreende o uso do congelador programável para resfriar as células de esperma para a dita temperatura de conservação em uma taxa de resfriamento na faixa de cerca de $0,1 - 0,3^{\circ}\text{C}$ por minuto.

[001501] H11'. Método, de acordo com a reivindicação H10', que adicionalmente compreende o uso do congelador programável para resfriar as células de esperma a partir da dita temperatura de conservação para uma temperatura de cerca de -15°C na dita primeira taxa de

cerca de 1 - 5°C por minuto.

[001502] H12'. Método, de acordo com a reivindicação H6', que adicionalmente compreende o uso do congelador programável para resfriar as células de esperma de uma temperatura de cerca de -18°C a pelo menos cerca de -30°C na dita segunda taxa de resfriamento de cerca de 8-12°C por minuto.

[001503] H13'. Método, de acordo com a reivindicação H12', que adicionalmente compreende o uso do congelador programável para resfriar as células de esperma da dita temperatura de conservação para uma temperatura de pelo menos cerca de -15°C na dita primeira taxa de resfriamento de cerca de 1 - 5°C por minuto.

[001504] H14'. Método, de acordo com a reivindicação H6', no qual as células de esperma são mantidas na dita temperatura de conservação por um período de cerca de 30 minutos.

[001505] H15'. Método, de acordo com qualquer das reivindicações H1'-H14', no qual a mistura de tingimento adicionalmente compreende um antioxidante.

[001506] H16'. Método, de acordo com a reivindicação H15', no qual o antioxidante é selecionado do grupo que consiste em piruvato, vitamina K, ácido lipóico, e uma combinação dos mesmos.

[001507] H17'. Método, de acordo com qualquer das reivindicações H1' ou H5'-H16', que adicionalmente compreende a colocação de células de esperma tingidas em um ambiente apresentando uma temperatura de pelo menos cerca de 37°C até que elas sejam introduzidas em um citômetro de fluxo.

[001508] H18'. Método, de acordo com qualquer das reivindicações H1' ou H5'-H16', que adicionalmente compreende a colocação das células de esperma tingidas em um ambiente apresentando uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C até que elas sejam introduzidas em um citômetro de fluxo.

[001509] H19'. Método, de acordo com a reivindicação H1', no qual a etapa de obter uma quantidade de células de esperma compreende a obtenção de uma população de células de esperma vivas apresentando a dita característica de DNA desejada em uma taxa de pelo menos 5.000 células de esperma por segundo.

[001510] H20'. Método, de acordo com a reivindicação H19', no qual a pureza da dita população é pelo menos de 85%.

J'. Controle de Temperatura Total (sem Tingimento de Alta Temperatura)

[001511] J1'. Método de processar células de esperma, que compreende as etapas de:

[001512] coletar uma amostra de sêmen contendo células de esperma de um animal macho;

[001513] transportar a amostra de sêmen para uma instalação de processamento de amostra;

[001514] executar uma verificação de controle de qualidade inicial na amostra de sêmen;

[001515] tingir as células de esperma na dita amostra de sêmen com um corante fluorescente seletivo de DNA;

[001516] separar as células de esperma com um citômetro de fluxo para obter uma ou mais populações de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada;

[001517] obter uma quantidade de células de esperma apresentando a característica de DNA desejada suspensa em um fluido;

[001518] ajustar a concentração da dita quantidade de células de esperma para se conseguir uma concentração desejada de células de esperma apresentando a característica de DNA desejada em uma suspensão de fluido;

[001519] acrescentar um crioprotetor a uma quantidade de células de esperma apresentando a dita característica desejada enquanto a dita

quantidade de células de esperma apresenta uma temperatura acima de uma temperatura de transição de vidro abaixo da qual as células de esperma são submetidas à danos originários de choque frio;

[001520] resfriar a dita quantidade de células de esperma e crioprotetor a partir da dita temperatura de transição de vidro para uma temperatura de conservação na faixa de cerca de 0 - 8°C;

[001521] manter a dita quantidade de células de esperma e crioprotetor em uma faixa de temperatura de cerca de 0 - 8°C por um período menor do que 60 minutos; e

[001522] super-resfriar a dita quantidade de espermas a uma temperatura abaixo de -40°C.

[001523] J2'. Método, de acordo com a reivindicação J1', no qual o dito crioprotetor é acrescentado, enquanto a dita quantidade de células de esperma apresenta uma temperatura acima de cerca de 20°C.

[001524] J3'. Método, de acordo com a reivindicação J1', no qual as células de esperma tingidas são colocadas em um ambiente apresentando uma temperatura na faixa de cerca de 20 - 25°C até que elas sejam separadas em um citômetro de fluxo.

[001525] J4'. Método, de acordo com a reivindicação J1', que adicionalmente compreende o uso de um congelador programável para resfriar a dita quantidade de espermas em uma primeira taxa de resfriamento da dita temperatura de conservação para uma temperatura que se aproxima de uma zona de temperatura crítica na qual a formação de cristal de gelo e mudanças na pressão osmótica danificam as células de esperma, e para subsequente resfriar a dita quantidade de células de esperma através da dita zona de temperatura crítica em uma segunda taxa de resfriamento que é mais rápida do que a dita primeira taxa de resfriamento.

[001526] J5'. Método, de acordo com a reivindicação J1', no qual a etapa de manter a dita quantidade de células de esperma compreende

a conservação da dita quantidade de células de esperma na dita temperatura de conservação por um período de menos de cerca de 40 minutos.

[001527] J6'. Método, de acordo com a reivindicação J1', no qual a etapa de manter a dita quantidade de células de esperma compreende a conservação da dita quantidade de células de esperma na dita temperatura de conservação por um período de cerca de 30 minutos.

[001528] J7'. Método, de acordo com qualquer das reivindicações J1'-J6', no qual a etapa de tingimento adicionalmente compreende o acréscimo de um antioxidante às células de esperma.

[001529] J8'. Método, de acordo com a reivindicação J7', no qual o antioxidante é selecionado do grupo que consiste de piruvato, vitamina K, ácido lipóico, e uma combinação dos mesmos.

[001530] J9'. Método, de acordo com a reivindicação J1', no qual a etapa de obter uma quantidade de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada compreende a obtenção de uma população de células de esperma vivas que apresentam a dita característica de DNA desejada em uma taxa de menos de 5.000 células de esperma por segundo.

[001531] J10'. Método, de acordo com a reivindicação J9', no qual a pureza da dita população de células de esperma é de pelo menos 85%.

K'. Controle de Temperatura Total (tingimento a frio)

[001532] K1'. Método de processar células de esperma, que compreende as etapas de:

[001533] coletar uma amostra de sêmen contendo células de esperma de um animal macho;

[001534] transportar a amostra de sêmen para uma instalação de processamento de esperma;

[001535] executar a verificação de controle de qualidade inicial na

amostra de sêmen;

[001536] resfriar as células de esperma a uma temperatura na faixa de cerca de 0 - 8°C antes que seja executada qualquer diluição substancial das células de esperma;

[001537] formar uma mistura compreendendo uma solução que contém as células de esperma e um corante seletivo de DNA e submeter a mistura a uma temperatura na faixa de 0 - 8°C para tingir as células de esperma;

[001538] separar as células de esperma com um citômetro de fluxo para obter uma ou mais populações de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada;

[001539] obter uma quantidade de células de esperma apresentando a característica de DNA desejada suspensa em um fluido;

[001540] ajustar a concentração da dita quantidade de células de esperma para se conseguir uma concentração desejada de células de esperma apresentando a característica de DNA desejada em uma suspensão de fluido;

[001541] acrescentar um crioprotetor à dita quantidade de células de esperma;

[001542] conservar a dita quantidade de células de esperma e o dito crioprotetor em uma temperatura de conservação na faixa de cerca de 0 - 8°C por um período na faixa de cerca de 30 minutos a 3 horas; e

[001543] super-resfriar a dita quantidade de células de esperma a uma temperatura abaixo de 40°.

[001544] K2'. Método, de acordo com a reivindicação K1', que adicionalmente compreende a etapa de substancialmente impedir o aquecimento das células em qualquer momento durante o processo.

[001545] K3'. Método, de acordo com a reivindicação K1', no qual a etapa de resfriar as células a uma temperatura na faixa de 0 - 8° compreende a colocação de um recipiente com as células de esperma em

um banho de água que está substancialmente na mesma temperatura que as células de esperma pré-resfriadas, e a colocação do banho de água em um ambiente que apresenta uma temperatura de menos de cerca de 8°C.

[001546] K4'. Método, de acordo com a reivindicação K3', no qual a etapa de resfriamento adicionalmente compreende o monitoramento da temperatura das células de esperma à medida que elas são resfriadas, e o acréscimo de gelo ao banho de água depois que as células de esperma foram resfriadas a uma temperatura menor do que cerca de 10°C.

[001547] K5'. Método, de acordo com a reivindicação K1', no qual o dito período de conservação está na faixa de cerca de 1 - 2 horas.

[001548] K6'. Método, de acordo com a reivindicação K1', no qual o dito período de conservação está na faixa de cerca de 90 minutos.

[001549] K7'. Método, de acordo com a reivindicação K1', no qual o dito período de conservação está na faixa de cerca de 30 minutos a menos de 60 minutos.

[001550] K8'. Método, de acordo com a reivindicação K1', no qual a etapa de super-resfriar a dita quantidade de células de esperma compreende o uso de um congelador programável para resfriar a dita quantidade de espermatozoides em uma taxa de resfriamento da dita temperatura de conservação a uma temperatura que se aproxima de uma zona de temperatura crítica na qual a formação de cristal de gelo e mudanças na pressão osmótica danificam a célula de esperma e para subsequente resfriar a dita quantidade de células de esperma através da dita zona de temperatura crítica em uma segunda taxa de resfriamento que é mais rápida que a dita primeira taxa de resfriamento.

[001551] K9'. Método, de acordo com a reivindicação K1', no qual a etapa de acrescentar um crioprotetor compreende o acréscimo de gli-

cerol.

[001552] K10'. Método, de acordo com a reivindicação K1', no qual a etapa de acrescentar um crioprotetor compreende o acréscimo de 7% de glicerol (v/v).

[001553] K11'. Método, de acordo com a reivindicação K1', no qual a etapa de obter uma quantidade de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada compreende a obtenção de uma população de células de esperma vivas apresentando a dita característica de DNA desejada em uma taxa de pelo menos 5.000 células de esperma por segundo.

[001554] K12'. Método, de acordo com a reivindicação K11', no qual a pureza da dita população de células de esperma é de pelo menos 85%.

L'. Sistema de Coleta (Aparelho)

[001555] L1'. Sistema de coleta para coletar um fluxo de gotículas separadas por um citômetro de fluxo de separação de gotículas que produz um fluxo de gotículas que se move ao longo de uma trajetória que inclui um componente horizontal, o sistema compreendendo um dispositivo de interceptação para interceptar as gotículas no dito fluxo à medida que elas se movem ao longo da dita trajetória, e um vaso de coleta disposto para coletar as ditas gotículas interceptadas.

[001556] L2'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L1', no qual o dispositivo de interceptação compreende uma superfície de impacto disposta através da dita trajetória contra a qual as ditas gotículas são adaptadas ao impacto.

[001557] L3'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L2', no qual a superfície de impacto é disposta através da dita trajetória em uma localização na qual as ditas gotículas apresentam um componente de velocidade ascendente.

[001558] L4'. Sistema, de coleta, de acordo com a reivindicação L2',

no qual pelo menos parte das gotículas contém partículas, e a superfície de impacto é revestida com uma substância que reduz os danos às partículas com o impacto com a superfície de impacto.

[001559] L5'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L4', no qual a dita substância compreende uma ou mais substância selecionadas do grupo que consiste de gema de ovo, albumina de soro bovino, e salina amortecedora de fosfato.

[001560] L6'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L4', no qual as ditas partículas são células de esperma.

[001561] L7'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L2', no qual o dito dispositivo de interceptação é configurado para guiar as ditas gotículas interceptadas para o vaso de coleta.

[001562] L8'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L7', no qual o dispositivo de interceptação compreende uma guia abaixo da dita superfície de impacto para guiar as ditas gotículas até o dito vaso de coleta.

[001563] L9'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L7', no qual o dispositivo de interceptação compreende um invólucro oco que define a dita superfície de impacto e que apresenta uma janela de entrada para a entrada de gotículas que se movem da dita trajetória para o dito invólucro para o impacto contra a dita superfície de impacto.

[001564] L10'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L1', no qual o dito fluxo de gotículas constitui um primeiro fluxo de gotículas, o dito dispositivo de interceptação constitui um primeiro dispositivo de interceptação, o dito vaso de coleta constitui um primeiro vaso de coleta, e o dito citômetro de fluxo também produz um segundo fluxo de gotículas que se move ao longo de uma segunda trajetória que é diferente da dita primeira trajetória, o dito sistema de coleta adicionalmente compreendendo um segundo dispositivo de interceptação para in-

interceptar gotículas que se movem ao longo da dita segunda trajetória e um segundo vaso de coleta para coletar gotículas interceptadas pelo segundo dispositivo de interceptação.

[001565] L11'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L10', no qual o dito primeiro dispositivo de interceptação apresenta uma janela no mesmo através da qual o dito segundo fluxo é adaptado para passar, e no qual o dito segundo dispositivo de interceptação é posicionado atrás do dito primeiro dispositivo de interceptação para interceptar as gotículas no segundo fluxo que passa através da dita janela.

[001566] L12'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L10', no qual o dito segundo dispositivo de interceptação é configurado para guiar as ditas gotículas interceptadas no segundo fluxo para o segundo vaso de coleta.

[001567] L13'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L1', no qual as ditas gotículas contêm partículas, o sistema de coleta adicionalmente compreendendo uma substância que reveste as superfícies de impacto dos dispositivos de interceptação para reduzir danos às ditas partículas com o impacto.

[001568] L14'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L13', no qual as ditas partículas compreendem células de espermatozoides vivos.

[001569] L15'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L13', no qual a dita substância compreende uma substância selecionada do grupo que consiste de gema de ovo, albumina de soro bovino, e salina amortecedora de fosfato.

[001570] L16'. Sistema de coleta, de acordo com a reivindicação L1', em combinação com um citômetro de fluxo posicionado para direcionar um fluxo de gotículas para o dispositivo de interceptação.

M'. Sistema de Coleta (Método)

[001571] M1'. Método de coletar gotículas separadas por um citômetro de fluxo de separação de gotículas que produz um fluxo de gotículas que se move ao longo de uma trajetória que inclui um componente horizontal, o dito método compreendendo as etapas de:

[001572] interceptar as ditas gotículas à medida que elas se movem ao longo da dita trajetória; e

[001573] coletar as ditas gotículas interceptadas em um primeiro vaso de coleta.

[001574] M2'. Método, de acordo com a reivindicação M1', no qual a dita etapa de coleta compreende a orientação das ditas gotículas interceptadas para o dito primeiro vaso de coleta.

[001575] M3'. Método, de acordo com a reivindicação M2', no qual a dita etapa de interceptação compreende o posicionamento de uma superfície de impacto através da dita trajetória em uma localização na qual as ditas gotículas apresentam um componente de velocidade ascendente.

[001576] M4'. Método, de acordo com a reivindicação M3', que adicionalmente compreende o ajuste da porção da dita superfície de impacto para acomodar diferentes trajetórias de gotículas.

[001577] M5'. Método, de acordo com a reivindicação M1', no qual o dito citômetro de fluxo produz um primeiro e um segundo fluxos de gotículas que se movem ao longo de respectivas primeira e segunda trajetórias, cada trajetória apresentando um componente horizontal, o dito método adicionalmente compreendendo a interceptação das ditas gotículas no dito segundo fluxo à medida que elas se movem ao longo da dita segunda trajetória, e a coleta das ditas gotículas interceptadas do segundo fluxo em um segundo vaso de coleta.

[001578] M6'. Método, de acordo com a reivindicação M5', no qual as ditas primeira e segunda trajetórias se encontram substancialmente em um plano.

[001579] M7'. Método, de acordo com a reivindicação M5', no qual as gotículas no dito primeiro fluxo são interceptadas pelo posicionamento de uma primeira superfície de impacto através da dita primeira trajetória em uma localização na qual as ditas gotículas apresentam um componente de velocidade ascendente, e no qual as gotículas no dito segundo fluxo são interceptadas pelo posicionamento de uma segunda superfície de impacto através da dita segunda trajetória em uma localização na qual as ditas gotículas apresentam um componente de velocidade ascendente.

[001580] M8'. Método, de acordo com a reivindicação M7', no qual a dita segunda superfície de impacto é posicionada em uma elevação diferente da dita primeira superfície de impacto.

[001581] M9'. Método, de acordo com a reivindicação M1', no qual as ditas gotículas contêm partículas e a etapa de interceptar as ditas gotículas compreende o uso de um dispositivo de interceptação para interceptar as ditas gotículas, o método adicionalmente compreendendo o contato do dito dispositivo de interceptação com uma composição para reduzir os danos às ditas partículas.

[001582] M10'. Método, de acordo com a reivindicação M9', no qual as ditas partículas compreendem células de esperma vivas.

[001583] M11'. Método, de acordo com a reivindicação M10', no qual a dita composição compreende uma substância selecionada do grupo que consiste de gema de ovo, albumina de soro bovino, e salina amortecedora de fosfato.

[001584] M12'. Método, de acordo com a reivindicação M10', no qual a etapa de colocar o dito dispositivo de interceptação em contato com uma composição compreende o embebimento do dito dispositivo de interceptação na dita composição por um período que é suficiente para que a composição seja absorvida e/ou aderida ao dispositivo de interceptação.

[001585] M13'. Método, de acordo com a reivindicação M12', no qual o dito período está na faixa de cerca de 30-90 minutos.

[001586] M14'. Método, de acordo com a reivindicação M13', no qual o dito período está na faixa de cerca de 30-60 minutos.

[001587] M15'. Método, de acordo com a reivindicação M14', no qual o dito período é de cerca de 60 minutos.

[001588] M16'. Método, de acordo com qualquer das reivindicações M10'-M15', no qual a etapa de coletar as ditas gotículas compreende a coleta das ditas gotículas em um vaso de coleta, o método adicionalmente compreendendo a etapa de colocar o vaso de coleta em contato com uma composição para reduzir danos às ditas partículas.

[001589] M17'. Método, de acordo com a reivindicação M16', adicionalmente no qual a etapa de colocar o vaso de coleta em contato com uma composição para reduzir os danos às partículas compreende o contato do vaso de coleta com a mesma composição usada para contactar o dispositivo de interceptação.

[001590] M18'. Método, de acordo com a reivindicação M16', no qual a etapa de colocar o vaso de coleta em contato com uma composição para reduzir danos às ditas partículas compreende o embebimento do vaso de coleta na dita composição por um período que é suficiente para que a composição seja absorvida e/ou aderida ao vaso de coleta.

[001591] M19'. Método, de acordo com a reivindicação M18', no qual o dito período está na faixa de cerca de 30-90 minutos.

[001592] M20'. Método, de acordo com a reivindicação M18', no qual o dito período é de cerca de 60 minutos.

N'. Combinações Sinérgicas

[001593] FCM de múltiplos canais (com estratégia de separação)

[001594] Na1'. Método de processar células de espermatozoide de animal, que compreende as etapas de:

[001595] separar as células de espermatozoide em diferentes populações

de células de esperma com base em uma ou mais características de DNA específicas com o uso de um processo de citômetro de fluxo que compreende a distribuição de um fluido de amostra contendo as células de esperma com base em uma dita ou mais características de DNA, e a operação das ditas unidades, enquanto compartilham de uma plataforma integrada que compreende pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de células de esperma; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética; (3) um alojamento comum; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (5) um processador comum para receber e processar a informação originária das unidades para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade; e (6) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar fluido contendo as ditas células de esperma nas ditas unidades de citometria de fluxo; e

[001596] variar a taxa na qual o fluido de amostra é dispensado em uma das unidades de citometria de fluxo como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de uma primeira população separada de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada; e (2) a quantidade de células de esperma apresentando a dita característica de DNA desejada em uma segunda população separada.

[001597] Na2'. Método, de acordo com a reivindicação Na1', que adicionalmente compreende a operação das ditas unidades de citometria de fluxo em paralelo.

[001598] Na3'. Método, de acordo com a reivindicação Na1', no qual uma dita ou mais características de DNA específicas compreendem a existência ou não de um cromossomo de sexo X ou Y em uma célula de esperma.

[001599] FCM de Múltiplos Canais com Processamento Digital

[001600] Nb1'. Método de processar células de esperma de animal,

que

[001601] compreende as etapas de:

[001602] separar as células de esperma em diferentes populações de células de esperma com base em uma ou mais características de DNA específicas com o uso de um processo de citometria de fluxo que compreende a distribuição de um fluido de amostra contendo as células de esperma em uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo, cada uma das quais sendo operável para separar as células de esperma com base em uma dita ou mais características de DNA, e a operação das ditas unidades enquanto compartilham de uma plataforma integrada que compreende pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de células de esperma; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética; (3) um alojamento comum; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (5) um processador comum para receber e processar informação originária das unidades para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade; e (6) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar fluido contendo as ditas células de esperma nas ditas unidades de citometria de fluxo; e

[001603] usar uma ou mais conversores do analógico para o digital para sincronicamente amostrar uma saída de variação de tempo originária de cada unidade de citometria de fluxo e prover uma saída incluindo a informação digital que corresponde à dita saída analógica de variação de tempo, onde a dita saída analógica de variação de tempo e a informação digital correspondente são indicativas da dita característica de DNA específica.

[001604] Nb2'. Método, de acordo com a reivindicação Nb1', no qual uma dita ou mais características de DNA específicas compreendem a existência ou não de um cromossomo de sexo X ou Y na célula de esperma.

[001605] FCM de Múltiplos Canais (com tingimento de alta temperatura)

[001606] Nc1'. Método de processar células de esperma de animal, que compreende as etapas de:

[001607] formar uma mistura de tingimento contendo as células de esperma e um corante fluorescente seletivo de DNA, e a submissão da mistura de tingimento a uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C; e

[001608] separar as células de esperma em diferentes populações de células de esperma com base em uma ou mais características de DNA específicas com o uso de um processo de citometria de fluxo que compreende a distribuição de um fluido de amostra contendo as células de esperma em uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo, cada uma das quais sendo operável pra separar as células de esperma com base em uma dita ou mais características de DNA, e a operação das ditas unidades enquanto compartilham de uma plataforma integrada que compreende pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de células de esperma; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética; (3) um alojamento comum; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (5) um processador comum para receber e processar a informação originária das unidades para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade: e (6) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar o fluido contendo as ditas células de esperma nas ditas unidades de citometria de fluxo.

[001609] Nc2'. Método, de acordo com a reivindicação Nc1', no qual o corante é um corante excitável por UV ou excitável por luz visível.

[001610] Nc3'. Método, de acordo com a reivindicação Nc2', no qual o corante é selecionado do grupo que consiste em uma bisbenzimidazina, SYBR-14, e um conjugado, um análogo, ou um derivativo dos mes-

mos.

[001611] Nc4'. Método, de acordo com qualquer das reivindicações Nc1'-Nc3', no qual a mistura de tingimento é submetida à temperatura por um período de tempo suficiente para permitir que o corante seja ligado ao DNA, de tal modo que as células de esperma conduzindo X e Y possam ser diferentemente separadas com base na fluorescência.

[001612] Nc5'. Método, de acordo com a reivindicação Nc4', no qual o período de tempo está na faixa de cerca de 1 - 160 minutos.

[001613] Nc6'. Método, de acordo com qualquer das reivindicações Nc1'-Nc5', no qual a mistura de tingimento adicionalmente compreende um antioxidante.

[001614] Nc7'. Método, de acordo com a reivindicação Nc1', no qual uma ou mais características compreendem a existência ou não de um cromossomo de sexo X ou Y na célula de esperma.

D. Múltiplos canais (com rápida criopreservação)

[001615] Nd1'. Método de processar células de esperma de animal, que compreende as etapas de:

[001616] separar as células de esperma em diferentes populações de células de esperma com base em uma ou mais características de DNA específicas com o uso de um processo de citometria de fluxo que compreende a distribuição de um fluido de amostra contendo as células de esperma em uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo, cada uma das quais sendo operável para separar as células de esperma com base em uma dita ou mais características de DNA, e a operação das ditas unidades, enquanto compartilham de uma plataforma integrada que compreende pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de células de esperma; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética; (3) um alojamento comum; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (5) um processador comum para receber e processar a informação origi-

nária das unidades para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade: e (6) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar o fluido contendo as ditas células de esperma nas ditas unidades de citometria de fluxo;

[001617] obter uma quantidade de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada de uma ou mais das populações separadas de células de esperma;

[001618] acrescentar um crioprotetor à dita quantidade de células de esperma;

[001619] resfriar a dita quantidade de células de esperma e crioprotetor a uma temperatura de conservação de cerca de 0-8°C;

[001620] manter as ditas células de esperma e o dito crioprotetor substancialmente na dita temperatura de conservação por um período menor do que 60 minutos; e

[001621] super-resfriar a dita quantidade de células de esperma a uma temperatura de -40°C.

[001622] Nd2'. Método, de acordo com a reivindicação Nd1', no qual a etapa de acrescentar um crioprotetor compreende o acréscimo de glicerol

[001623] Nd3'. Método, de acordo com a reivindicação Nd1', no qual uma dita ou mais características de DNA específicas compreendem a existência ou não de um cromossomo de sexo X ou Y na célula de esperma.

[001624] Nd4'. Método, de acordo com a reivindicação Nd1', no qual a etapa de resfriar a dita quantidade de células de esperma à dita temperatura de conservação compreende o uso de uma taxa de resfriamento que é selecionada de modo que a dita quantidade de células de esperma seja resfriada a partir de uma temperatura acima de uma temperatura de transição de vidro abaixo da qual as células de esperma são submetidas a danos originários de choque frio para a dita tem-

peratura de conservação em cerca de 90 minutos.

[001625] Nd5'. Método, de acordo com a reivindicação Nd4', no qual a taxa de resfriamento é uma taxa de resfriamento substancialmente constante na faixa de cerca de 0,1-0,3°C por minuto.

[001626] Nd6'. Método, de acordo com a reivindicação Nd1', no qual a etapa de super-resfriar a dita quantidade de esperma compreende o resfriamento das células de esperma em uma primeira taxa de resfriamento a uma temperatura que se aproxima de uma zona de temperatura críticas na qual a formação de cristal de gelo e as mudanças na pressão osmótica danificam as células de esperma, e o resfriamento do esperma em uma segunda taxa de resfriamento mais rápida do que a dita primeira taxa de resfriamento a uma temperatura que é menor do que cerca de -30°C.

[001627] Nd7'. Método de Nd1', que adicionalmente compreende:

[001628] a formação de uma mistura de tingimento contendo as células de esperma e um corante fluorescente seletivo de DNA, e a submissão da mistura de tingimento a uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C.

e. Estratégia de Separação (com tingimento de alta temperatura)

[001629] Ne1'. Método de processar células de esperma de animal, que compreende as etapas de:

[001630] formar uma mistura de tingimento contendo as células de esperma e um corante fluorescente seletivo de DNA, e a submissão da mistura de tingimento a uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C;

[001631] dispensar um fluxo de fluido da dita mistura de tingimento contendo as células de esperma em uma primeira localização fazendo com que o dito fluxo se rompa em gotículas em uma segunda localização, as ditas gotículas compreendendo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma apresentando um cro-

mosso de sexo desejado, segundas gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma apresentando um cromossomo de sexo indesejado, e terceiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma apresentando o cromossomo de sexo desejado e uma ou mais células de esperma apresentando o cromossomo de sexo indesejado;

[001632] separar as ditas primeiras gotículas a partir das ditas segundas e terceiras gotículas;

[001633] coletar as ditas primeiras gotículas para prover pelo menos uma população de células de esperma apresentando um cromossomo de sexo desejado;

[001634] identificar uma quantidade de células de esperma apresentando o cromossomo de sexo desejado em pelo menos uma dita população; e

[001635] variar a taxa na qual o fluido é dispensado na dita primeira localização como uma função da quantidade de células de esperma identificada como apresentando o cromossomo de sexo desejado em pelo menos uma dita população com relação ao número total de células de esperma apresentando o cromossomo de sexo desejado nas ditas primeiras, segundas e terceiras gotículas.

[001636] Ne2'. Método de processar células de esperma de animal, que compreende as etapas de:

[001637] formar uma mistura de tingimento contendo as células de esperma e um corante fluorescente seletivo de DNA, e a submissão da mistura de tingimento a uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C;

[001638] dispensar um fluxo de fluido da dita mistura de tingimento contendo as células de esperma em uma primeira localização fazendo com que o dito fluxo se rompa em gotículas em uma segunda localização, as ditas gotículas compreendendo primeiras gotículas contendo,

cada qual, uma ou mais células de esperma apresentando um cromossomo de sexo desejado, segundas gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma apresentando um cromossomo de sexo indesejado, e terceiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma apresentando o cromossomo de sexo desejado e uma ou mais células de esperma apresentando o cromossomo de sexo indesejado;

[001639] separar as ditas primeiras gotículas e as terceiras gotículas a partir das ditas segundas gotículas;

[001640] coletar as ditas primeiras e terceiras gotículas para prover pelo menos uma população de células de esperma apresentando um cromossomo de sexo desejado;

[001641] identificar uma quantidade de células de esperma apresentando o cromossomo de sexo indesejado em pelo menos uma dita população; e

[001642] variar a taxa na qual o fluido é dispensado na dita primeira localização como uma função da quantidade de células de esperma identificada como apresentando o cromossomo de sexo indesejado em pelo menos uma dita população.

f. Tingimento de alta temperatura (com rápida criopreservação)

[001643] Nf1'. Método de processar células de esperma de animal, que compreende as etapas de:

[001644] formar uma mistura de tingimento contendo as células de esperma e um corante fluorescente seletivo de DNA, e submeter a mistura de tingimento a uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C;

[001645] separar as ditas células de esperma na dita mistura de tingimento cm base em uma cada;

[001646] obter uma quantidade de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada;

[001647] acrescentar um crioprotetor da dita quantidade de células de esperma;

[001648] resfriar a dita quantidade de células de esperma e do crioprotetor a uma temperatura de conservação de cerca de 0-8°C;

[001649] manter as ditas células de esperma e o dito crioprotetor substancialmente na temperatura de conservação por um período de menos de 60 minutos; e

[001650] super-resfriar a dita quantidade de células de esperma a uma temperatura de -40°C.

[001651] Nf2'. Método, de acordo com a reivindicação Nf1, no qual a etapa de acrescentar um crioprotetor compreende o acréscimo de glicerol.

[001652] Nf3'. Método, de acordo com a reivindicação Nf1, no qual a dita característica de DNA específica está na existência ou não de um cromossomo de sexo X ou Y em uma célula de esperma.

[001653] Nf4'. Método, de acordo com a reivindicação Nf1, no qual a etapa de resfriar a dita quantidade de células de esperma compreende o uso de uma taxa de resfriamento que é selecionada de modo que a dita quantidade de células de esperma seja resfriada a cerca de 0-8°C em cerca de 90 minutos.

[001654] Nf5'. Método, de acordo com a reivindicação Nd4, no qual a taxa de resfriamento é uma taxa de resfriamento substancialmente constante na faixa de cerca de 0,1 - 0,3°C por minuto.

[001655] Nf6'. Método, de acordo com a reivindicação Nf1, no qual a etapa de super-resfriar a dita quantidade de esperma compreende o resfriamento das células de esperma em uma primeira taxa de resfriamento a uma temperatura que se aproxima de uma zona de temperatura crítica na qual a formação de cristal e as mudanças na pressão osmótica danificam as células de esperma, e o resfriamento do esperma em uma segunda taxa de resfriamento mais rápida do que a

dita primeira taxa de resfriamento em uma temperatura menor que cerca de -30°C.

g. Múltiplas Combinações

[001656] Ng1'. (tingimento de alta temperatura/separação de múltiplos canais/rápida criopreservação)

[001657] Método de processar células de esperma de animal, que compreende as etapas de:

[001658] formar uma mistura de tingimento contendo as células de esperma e um corante fluorescente seletivo de DNA, e submeter a mistura de tingimento a uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C;

[001659] separar as células de esperma em diferentes populações de células de esperma com base em uma ou mais características de DNA específicas com o uso de um processo de citometria de fluxo que compreende a distribuição de um fluido de amostra em uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo, cada uma das quais sendo operável para separar as células de esperma com base em uma dita ou mais características de DNA, e a operação das ditas unidades, enquanto compartilham de uma plataforma integrada que compreende pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de células de esperma; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética; (3) um alojamento comum; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (5) um processador comum para receber e processar a informação originária das unidades para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade; e (6) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar o fluido contendo as ditas células de esperma nas ditas unidades de citometria de fluxo;

[001660] obter uma quantidade de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada de uma ou mais das populações

separadas de células de esperma;

[001661] acrescentar um crioprotetor à dita quantidade de células de esperma;

[001662] resfriar a dita quantidade de células de esperma e de crioprotetor a uma temperatura de conservação de cerca de 0-8°C;

[001663] manter as ditas células de esperma e o dito crioprotetor substancialmente na dita temperatura de conservação por um período menor do que 60 minutos; e

[001664] super-resfriar a dita quantidade de células de esperma a uma temperatura de -40°C.

[001665] Ng2'. (Tingimento de alta temperatura/separação de múltiplos canais/estratégia de separação de pureza elevada)

[001666] Método de processar células de esperma de animal, compreendendo as etapas de:

[001667] formar uma mistura de tingimento contendo as células de esperma e um corante fluorescente seletivo de DNA, e submeter a mistura de tingimento a uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C;

[001668] distribuir um fluxo de fluido da dita mistura de tingimento contendo as células de esperma em cada de uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo e usar as unidades de citometria de fluxo para romper cada fluxo de fluido em gotículas, as ditas gotículas compreendendo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma apresentando um cromossomo de sexo desejado, segundas gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma apresentando um cromossomo de sexo indesejado, e terceiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células apresentando o cromossomo de sexo desejado e uma ou mais células de esperma apresentando o cromossomo de sexo indesejado;

[001669] separar as ditas primeiras gotículas das segundas e tercei-

ras gotículas com o uso de um processo de citometria de fluxo de separação de gotícula que compreende a operação da dita pluralidade de unidades de citometria de fluxo enquanto compartilham de uma plataforma integrada que compreende pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de células de esperma; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética; (3) um alojamento comum; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (5) um processador comum para receber e processar a informação originária das unidades para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade; e (6) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar fluido contendo as ditas células de esperma nas ditas unidades de citometria de fluxo;

[001670] coletar as ditas primeiras gotículas para prover pelo menos uma população de células de esperma apresentando um cromossomo de sexo desejado;

[001671] identificar uma quantidade de células de esperma apresentando o cromossomo de sexo desejado em pelo menos uma dita população; e

[001672] variar a taxa na qual o fluido é dispensado em uma ou mais das unidades de citometria de fluxo como um função da quantidade de células de esperma identificada como apresentando o cromossomo de sexo desejado em pelo menos uma dita população com relação ao número total de células de esperma apresentando o cromossomo de sexo desejado nas ditas primeiras, segundas e terceira gotículas.

[001673] Ng3'. (Tingimento de alta temperatura/separação de múltiplos canais/estratégia de separação de alta recuperação)

[001674] Método de processar células de esperma de animal, que compreende as etapas de:

[001675] formar uma mistura de tingimento contendo as células de esperma e um corante fluorescente seletivo de DNA, e submeter a

mistura de tingimento a uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C;

[001676] distribuir um fluxo de fluido da dita mistura de tingimento contendo as células de esperma em cada de uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo e usar as unidades de citometria de fluxo para romper cada fluxo de fluido em gotículas, as ditas gotículas compreendendo primeiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma apresentando um cromossomo de sexo desejado, segundas gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células de esperma apresentando um cromossomo de sexo indesejado, e terceiras gotículas contendo, cada qual, uma ou mais células apresentando o cromossomo de sexo desejado e uma ou mais células de esperma apresentando o cromossomo de sexo indesejado;

[001677] separar as células de esperma em diferentes populações de células de esperma com base em uma ou mais características de DNA específicas com o uso de um processo de citometria de fluxo que compreende a distribuição de um fluido de amostra contendo as células de esperma em uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo, cada uma das quais sendo operável pra separar as células de esperma com base em uma dita ou mais características de DNA, e a operação das ditas unidades enquanto compartilham de uma plataforma integrada que compreende pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de células de esperma; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética; (3) um alojamento comum; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (5) um processador comum para receber e processar a informação originária das unidades para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade: e (6) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar o fluido contendo as ditas células de esperma nas ditas unidades de citometria de fluxo;

[001678] coletar as ditas primeiras e terceiras gotículas para prover pelo menos uma população de células de esperma apresentando um cromossomo de sexo desejado;

[001679] identificar uma quantidade de células de esperma apresentando o cromossomo de sexo desejado em pelo menos uma dita população; e

[001680] variar a taxa na qual o fluido é dispensado em uma ou mais das unidades de citometria de fluxo como uma função da quantidade de células de esperma identificada como apresentando o cromossomo de sexo indesejado em pelo menos uma dita população;

[001681] Ng4'. (Tingimento de alta temperatura/separação de múltiplos canais/estratégia de separação/rápida criopreservação)

[001682] Método de processar células de esperma de animal, que compreende as etapas de:

[001683] formar uma mistura de tingimento contendo as células de esperma e um corante fluorescente seletivo de DNA, e submeter a mistura de tingimento a uma temperatura de pelo menos cerca de 40°C;

[001684] distribuir um fluxo de fluido da dita mistura de tingimento contendo as células de esperma em cada de uma pluralidade de unidades de citometria de fluxo, usar as unidades de citometria de fluxo para romper cada fluxo de fluido em gotículas, e separar as ditas gotículas de acordo com uma ou mais das características de DNA específicas das células de esperma contidas nas gotículas para se obter uma ou mais populações de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada com o uso de um processo de citometria de fluxo de separação de gotículas compreendendo a operação da dita pluralidade de unidades de citometria de fluxo, enquanto compartilham de uma plataforma integrada compreendendo pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de células de esperma;

(2) uma fonte comum de radiação eletromagnética; (3) um alojamento comum; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (5) um processador comum para receber e processar a informação originária das unidades para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade; e (6) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar o fluido contendo as ditas células de esperma nas ditas unidades de citometria de fluxo;

[001685] variar a taxa na qual o fluido é dispensado em uma ou mais das unidades de citometria de fluxo como uma função de pelo menos um dos seguintes itens: (1) a pureza de uma dita ou mais populações de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada; e (2) a quantidade de células de esperma apresentando a característica de DNA desejada em uma dita ou mais populações de células de esperma com relação ao número total de células de esperma apresentando a característica de DNA desejada nas ditas gotículas;

[001686] acrescentar um crioprotetor para proteger uma quantidade de células de esperma obtidas a partir de uma dita ou mais populações de células de esperma;

[001687] resfriar a dita quantidade de células de esperma e do dito crioprotetor a uma temperatura de conservação de cerca de 0-8°C;

[001688] manter as ditas células de esperma e o dito crioprotetor substancialmente na dita temperatura de conservação por um período de menos de 60 minutos; e

[001689] super-resfriar a dita quantidade de células de esperma a uma temperatura de -40°C.

O'. Linha de Tempo Total

[001690] O1'. Método de processar células de esperma de animal, que compreende as etapas de:

[001691] coletar células de esperma de um animal macho;

[001692] tingir as células de esperma com um corante fluorescente

seletivo de DNA;

[001693] iluminar as células de esperma com radiação eletromagnética para fazer com que o corante fluorescente seletivo de DNA emita luz fluorescente;

[001694] detectar luz fluorescente emitida pelas células de esperma;

[001695] analisar a luz fluorescente emitida pelas células de esperma para determinar uma ou mais características de DNA específicas da célula de esperma;

[001696] separar as células de esperma em múltiplas populações de células de esperma com base em uma dita ou mais características de DNA específicas;

[001697] obter uma quantidade de células de esperma apresentando uma característica de DNA desejada originária de uma das ditas múltiplas populações de células de esperma; e

[001698] super-resfriar a dita quantidade de células de esperma;

[001699] onde a dita etapa de super-resfriamento é completada em menos de cerca de 12 horas depois que as células são coletadas.

[001700] O2'. Método, de acordo com a reivindicação O1', no qual a etapa de super-resfriar a dita quantidade de células de esperma é completada em menos de cerca de 8 horas depois que as células de esperma são coletadas.

[001701] O3'. Método, de acordo com a reivindicação O1', no qual a etapa de super-resfriar as ditas células de esperma é completada em menos de cerca de 6 horas depois que as células de esperma são coletadas.

[001702] O4'. Método, de acordo com a reivindicação O1', no qual a etapa de super-resfriar a dita quantidade de células de esperma é completada em menos de cerca de 3 horas depois que as células de esperma são coletadas.

[001703] O5'. Método, de acordo com a reivindicação O1', no qual a

etapa de super-resfriar a dita quantidade de células de esperma é completada em menos de cerca de 2 horas depois que as células de esperma são coletadas.

[001704] O6'. Método, de acordo com a reivindicação O1', no qual a etapa de super-resfriar a dita quantidade de células de esperma é completada em menos de cerca de 1 hora depois que as células de esperma são coletadas.

[001705] O7'. Método, de acordo com a reivindicação O1', no qual as células de esperma compreendem células de esperma vivas.

[001706] O8'. Método, de acordo com a reivindicação O7', no qual uma dita ou mais características de DNA compreendem a existência ou não de um cromossomo X ou Y na célula de esperma.

[001707] O9'. Método, de acordo com a reivindicação O1', que adicionalmente compreende as etapas de descongelar a dita quantidade de células de esperma depois da etapa de super-resfriamento e a subsequente fertilização de uma célula de ovo com uma célula de esperma a partir da dita quantidade de células de esperma por meio de inseminação artificial.

[001708] O10'. Método, de acordo com a reivindicação O1', que adicionalmente produz uma pluralidade de quantidades de células de esperma apresentando uma característica desejada e a distribuição da dita pluralidade de quantidades de células de esperma a criadores de animais através de um sistema de distribuição comercial.

P'. Velocidades de Separação

[001709] P1'. Método de separar células de esperma vivas de acordo com o teor de cromossomo, que compreende:

[001710] acrescentar um corante fluorescente seletivo de DNA a um suprimento de células de esperma vivas;

[001711] fazer com que um fluido de amostra contendo as ditas células de esperma e um fluido de revestimento fluam através de um bocal

de orientação que tende a girar as células de esperma para uma orientação desejada, os ditos fluido de amostra e fluido de revestimento saindo do bocal como um fluxo de fluido compreendendo um fluxo de núcleo formado pelo fluido de amostra e células de esperma e um fluxo de fluido de revestimento que circunda o fluxo de núcleo;

[001712] aplicação de energia acústica ao bocal para fazer com que o fluxo de fluido se rompa em um fluxo de gotículas em uma localização de ruptura de gotícula a jusante do bocal;

[001713] direcionar um feixe de radiação eletromagnética para intersectar o fluxo de fluido em uma localização de interrogação a montante da localização de ruptura de gotículas para excitar o corante fluorescente nas células de esperma, produzindo assim emissões fluorescentes a partir das células de esperma;

[001714] detectar as emissões fluorescentes com um fotodetector que emite um sinal analógico de variação de tempo indicativo da intensidade de emissões fluorescentes detectadas;

[001715] eletronicamente processar o dito sinal analógico de variação de tempo para determinar o teor dos cromossomos de uma pluralidade de células de esperma;

[001716] seletivamente aplicar uma carga eletrostática ao fluxo de fluido para seletivamente aplicar ou não uma carga elétrica às gotículas de acordo com o teor dos cromossomos das células de esperma contidas nas gotículas;

[001717] usar um campo elétrico para defletir as gotículas de acordo com sua carga, separando assim as células de esperma contidas em gotículas apresentando a mesma carga das células de esperma contidas em gotículas apresentando uma carga diferente; e

[001718] coletar pelo menos uma população de células de esperma vivas em uma taxa de pelo menos 5.000 células de esperma por segundo.

[001719] P2'. Método de P1', no qual pelo menos uma população coletada na etapa de coleta apresenta uma pureza de pelo menos 85%.

[001720] P3'. Método de P1', no qual a dita etapa de coleta compreende a coleta de pelo menos uma população de células de esperma vivas em uma taxa de pelo menos 6.000 células de esperma por segundo.

[001721] P4'. Método de P1', no qual a dita etapa de coleta compreende a coleta de pelo menos uma população de células de esperma vivas em uma taxa de pelo menos 7.000 células de esperma por segundo.

[001722] P5'. Método de P1', que adicionalmente compreende a operação de duas ou mais unidades de citometria em paralelo, de modo que cada uma execute as etapas de (b) a (i), onde elas compartilham de uma plataforma integrada, a dita plataforma integrada compreendendo um ou mais dos seguintes elementos: (1) um suprimento comum de células de esperma; (2) uma fonte comum de radiação eletromagnética; (3) um alojamento comum; (4) uma entrada comum para controlar a operação das unidades; (5) um processador comum para receber e processar a informação originária das unidades para permitir a avaliação da operação de uma unidade com relação à outra unidade; e (6) um sistema comum de distribuição de fluido para dispensar o fluido contendo as ditas células de esperma nas ditas unidades de citometria de fluxo;

[001723] P6'. Método de P1', no qual a etapa de operar as ditas duas ou mais unidades de citometria de fluxo enquanto elas compartilham de uma plataforma integrada compreende a operação de um laser de estado sólido travado por modo para produzir um único feixe compreendendo uma pluralidade de pulsos eletromagnéticos, a potência de pico de cada pulso sendo maior do que a saída de potência média do laser, a divisão do único feixe em dois ou mais feixes, e o direciona-

mento de cada um dos ditos dois ou mais feixes em uma das unidades de citometria de fluxo.

R'. CSD & varredura de ranhura

a. Células de esperma

[001724] R1'. Método de analisar características de DNA de cromossomos de células de esperma de animal em um fluxo de fluido apresentando uma direção de fluxo, cada célula de esperma apresentando uma cabeça com um núcleo compreendendo uma região de cromossomo localizada contendo pelo menos um cromossomo, o dito núcleo apresentando um comprimento na direção do fluxo de fluido, o dito método compreendendo:

[001725] a focalização de um feixe de radiação eletromagnética no fluxo de fluido como um ponto geralmente elíptico apresentando um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos à direção do fluxo de fluido e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende paralela à direção do fluxo de fluido, a largura do ponto de feixe sendo menor que o comprimento do dito núcleo, as ditas células de esperma sendo adaptadas para passarem através do dito ponto, resultando em emissões de radiação eletromagnética originárias das células de esperma, incluindo emissões originárias das ditas regiões de cromossomo indicativas de características de DNA de cromossomo das regiões;

[001726] a detecção e a conversão de pelo menos parte das ditas emissões originárias das regiões de cromossomo em sinais elétricos analógicos de variação de tempo indicativos das ditas características de DNA de cromossomo;

[001727] a amostragem digital do sinal analógico de variação de tempo e a provisão de uma saída incluindo informação digital que corresponde ao dito sinal analógico de variação de tempo;

[001728] a análise da informação digital para extrair informação indi-

cativa de um derivativo dos sinais analógicos de variação de tempo; e
[001729] a classificação de pelo menos parte das células de esperma como apresentando uma característica de DNA de cromossomo específica com base em pelo menos parte da dita informação extraída.

[001730] R2'. Método, de acordo com a reivindicação R1', no qual as ditas características de DNA de cromossomo são indicativas do sexo das células de esperma.

[001731] R3'. Método, de acordo com a reivindicação R2', no qual as ditas células de esperma são células de esperma bovino.

[001732] R4'. Método, de acordo com a reivindicação R3', no qual a dita região de cromossomo é localizada dentro de uma área do núcleo que se estende em não mais de cerca de 20% do comprimento do núcleo em cada lado de um centro longitudinal do núcleo.

[001733] R5'. Aparelho, de acordo com a reivindicação R3', no qual a dita região de cromossomo é localizada dentro de uma área do núcleo que se estende em não mais de cerca de 10%-15% do comprimento do núcleo em cada lado de um centro longitudinal do núcleo.

[001734] R6'. Método, de acordo com a reivindicação R1', no qual a etapa de amostragem digital compreende a amostragem sincrônica da saída analógica de variação de tempo.

[001735] R7'. Método, de acordo com a reivindicação R1', no qual a dita largura do ponto é menor do que cerca de 3,0 μm .

[001736] R8'. Método, de acordo com a reivindicação R7', no qual o dito comprimento do ponto é maior do que cerca de 100 μm .

[001737] R9'. Método, de acordo com a reivindicação R1', que adicionalmente compreende a aplicação de uma força sobre as células de esperma no fluxo que tende a trazê-las para uma orientação desejada antes que o fluxo passe através do dito feixe.

[001738] R10'. Método, de acordo com a reivindicação R1', que adicionalmente compreende a separação de gotículas das ditas células

de esperma de acordo com as ditas características de DNA de cromossomo.

[001739] R11'. Método, de acordo com a reivindicação R1', que adicionalmente compreende uma separação por fotodeterioração das ditas células de esperma de acordo com as ditas características de DNA de cromossomo.

[001740] R12'. Método, de acordo com a reivindicação R1', que adicionalmente compreende a separação de ligação de fluido de células de esperma de acordo com as ditas características de DNA de cromossomo.

[001741] R13'. Método, de acordo com a reivindicação R1', no qual a dita característica de derivativo compreende o grau de inclinação do sinal analógico de variação de tempo em um ponto do sinal com relação a um valor limite.

b. Partículas Genéricas

[001742] R14'. Método de analisar partículas em um fluxo de fluido apresentando uma direção de fluxo, o método compreendendo:

[001743] a focalização de um feixe de radiação eletromagnética no fluxo de fluido como um ponto geralmente elíptico apresentando um comprimento ao longo de um eixo principal que se estende geralmente em ângulos retos à direção do escoamento do fluxo e uma largura ao longo de um eixo secundário que se estende geralmente paralela à direção do escoamento do fluxo, a largura do ponto de feixe sendo menor que o tamanho das ditas partículas, as ditas partículas sendo adaptadas para passarem através do dito ponto, resultando em emissões de radiação eletromagnética das partículas;

[001744] a detecção e a conversão de pelo menos parte das ditas emissões em sinais elétricos analógicos de variação de tempo indicativos das características das partículas;

[001745] a amostragem digital do sinal analógico de variação de

tempo e a provisão de uma saída incluindo a informação digital que corresponde ao sinal analógico de variação de tempo;

[001746] a análise da informação digital para extrair informação indicativa de uma característica de derivativo de sinais analógicos de variação de tempo; e

[001747] a classificação de pelo menos algumas das partículas como apresentando uma característica específica com base pelo menos em parte na dita informação extraída.

[001748] R15'. Método, de acordo com a reivindicação R14', no qual a etapa de amostragem digital compreende a amostragem sincrônica da saída analógica de variação de tempo.

[001749] R16'. Método, de acordo com a reivindicação R14', que adicionalmente compreende a separação de gotículas de gotículas das ditas partículas de acordo com a dita classificação.

[001750] R17'. Método, de acordo com a reivindicação R14', que adicionalmente compreende uma separação por fotodeterioração das ditas células de esperma de acordo com as ditas características de DNA de cromossomo.

[001751] R18'. Método, de acordo com a reivindicação R14', que adicionalmente compreende a separação de ligação de fluido de células de esperma de acordo com as ditas características de DNA de cromossomo.

[001752] R19'. Método, de acordo com a reivindicação R14', no qual a característica de derivativo compreende o grau de inclinação do sinal analógico de variação de tempo em um ponto do sinal com relação a um valor limite.

S'. Aparelho FCM de Laser Pulsado

[001753] S1'. Aparelho de citometria de fluxo, que compreende:

[001754] um canal de fluxo para direcionar um fluxo de fluido contendo partículas de amostra através de uma localização de interroga-

ção de partículas;

[001755] um laser operável para emitir uma pluralidade de pulsos de radiação eletromagnética (EMR), cada pulso apresentando uma potência de pico que excede a potência média do laser, os ditos pulsos sendo direcionados ao longo de um percurso de feixe originário do laser para a localização de interrogação de partícula;

[001756] um circuito de sincronização operável para produzir um sinal de sincronização indicativo da chegada de pulso na localização de interrogação;

[001757] um detector adaptado para detectar a EMR a partir da localização de interrogação e operável para emitir um sinal analógico de variação de tempo indicativo da intensidade da EMR detectada;

[001758] um conversor do analógico para o digital adaptado para receber o sinal analógico de variação de tempo como uma entrada e para amostrar o sinal analógico para produzir uma saída digitalizada;

[001759] um processador eletrônico operável para analisar a saída digitalizada do conversor do analógico para o digital como uma função do sinal de sincronização.

[001760] S2'. Aparelho de S1', no qual o laser é operável para emitir pulsos de EMR apresentando uma largura de cerca de 1-100 picossegundos em uma frequência de pulso de cerca de 50-150 MHz em uma potência de cerca de 100-500 milliwatts.

[001761] S3'. Aparelho de S2', no qual o laser é operável para emitir pulsos de EMR apresentando uma largura de cerca de 5-20 picossegundos em uma frequência de cerca de 70-100 MHz.

[001762] S4'. Aparelho de S1', no qual o circuito de sincronização compreende um sensor adaptado para detectar a luz que corresponde aos pulsos de EMR incluindo luz dispersa gerada pela interação de cada pulso com um fluxo de fluido ou incluindo luz dos pulsos de EMR.

[001763] S5'. Aparelho de S1', no qual o circuito de sincronização

compreende um relógio que é operável para disparar o laser para emitir um pulso.

[001764] S6'. Aparelho de S1', no qual o detector é adaptado para detectar emissões fluorescentes estimuladas pela extração de energia dos pulsos.

[001765] S7'. Aparelho de S1', no qual o laser compreende um laser de estado sólido travado por modo.

[001766] S8'. Aparelho de S1', no qual o laser compreende um laser comutado Q.

[001767] S9'. Aparelho de S1', no qual o laser compreende um laser de despejo em cavidade.

[001768] S10'. Aparelho de S1', no qual o detector é um tubo fotomultiplicador.

[001769] S11'. Aparelho de S9', no qual o tubo fotomultiplicador apresenta um tempo de resposta de menos de cerca de 2 nanossegundos.

[001770] S12'. Aparelho de S1', no qual o processador eletrônico é operável para processar a saída digitalizada como uma forma de onda de pulso.

[001771] S13'. Aparelho de S12', no qual o processador eletrônico é operável para extrair pelo menos uma das seguintes características da saída digitalizada: diferença crítica de grau de inclinação, tempo de elevação de pulso, pico do pulso, e área do pulso.

T'. Método de Laser Pulsado

[001772] T1'. Método de analisar partículas contidas em um fluxo de fluido à medida que elas passam através de uma localização de inter-rogação, o dito método compreendendo as etapas de:

[001773] emitir uma pluralidade de pulsos de radiação eletromagnética (EMR) originários de um laser, onde uma potência de pico de cada pulso excede a potência média do laser;

[001774] intermitentemente iluminar o fluxo de fluido e as partículas contidas no mesmo com o direcionamento dos ditos pulsos ao longo do percurso de feixe do laser para a localização de interrogação;

[001775] detectar a EMR originária da localização de interrogação;

[001776] gerar um sinal analógico de variação de tempo indicativo da intensidade da EMR detectada;

[001777] gerar um sinal de sincronização indicativo da chegada de um pulso na localização de interrogação;

[001778] converter o sinal analógico de variação de tempo em um sinal digital; e

[001779] analisar o sinal digital para determinar as características das partículas no fluxo de fluido.

[001780] T2'. Método de T1', no qual a etapa de converter o sinal analógico de variação de tempo em um sinal digital compreende a amostragem do sinal analógico em um tempo que é sincronizado para coincidir com a iluminação do fluxo de fluido por um pulso.

[001781] T3'. Método de T1', no qual a etapa de iluminar o fluxo de fluido resulta em excitação de um fluoróforo associado com as ditas partículas e a etapa de converter o sinal analógico de variação de tempo em sinal digital compreende a amostragem do sinal analógico em um tempo predeterminado depois da iluminação da interrogação e dentro da queda de vida fluorescente do dito fluoróforo.

[001782] T4'. Método de T1', no qual cada pulso contém potência suficiente para satura o dito fluoróforo.

[001783] T5'. Método de T1', no qual a etapa de detectar luz originária da localização de interrogação compreende o uso de um tubo fotomultiplicador para detectar as emissões fluorescentes de um fluoróforo associado com as ditas partículas.

[001784] T6'. Método de T1', no qual a etapa de emitir pulsos de radiação eletromagnética compreende a etapa de emitir entre cerca de

50 - 150 milhões de pulsos por segundo, no qual cada pulso apresenta uma largura entre cerca de 1-100 picossegundos.

[001785] T7'. Método de T1', no qual a etapa de gerar um sinal de sincronização compreende a detecção de luz dispersa resultante da interação de um pulso com o fluxo de fluido.

[001786] T8'. Método de T1', no qual a etapa de gerar um sinal de sincronização compreende a geração de um sinal de relógio e a etapa de emitir uma pluralidade de pulsos EMR originários de um laser compreende o uso do sinal de relógio para disparar o laser para emitir um pulso.

[001787] T9'. Método de T1', no qual a etapa de analisar o sinal digital compreende a análise do sinal digital como uma forma de onda de pulso.

[001788] T10'. Método de T9', no qual a etapa de analisar o sinal digital adicionalmente compreende a extração de pelo menos uma das seguintes características do sinal: diferença crítica do grau de inclinação, tempo de elevação do pulso, pico do pulso e área do pulso.

[001789] T11'. Método de T1', no qual as ditas partículas compreendem células de esperma.

U' [Reservada]

V' Otimização do CV

[001790] V1'. Processo para avaliar um conjunto de condições para tingir uma população de células para separação, a população compreendendo um primeiro tipo e um segundo tipo de célula, o processo compreendendo:

[001791] (a) o tingimento de uma fração da população de células com um corante fluorescente de acordo com um conjunto de condições de tingimento;

[001792] (b) a exposição das células tingidas à radiação eletromagnética à medida que as células são passadas através de uma localiza-

ção de interrogação de um citômetro de fluxo em uma taxa R;

[001793] (c) a determinação de uma característica de emissão de fluorescência das células expostas;

[001794] (d) o uso da característica de fluorescência determinada para classificar as células expostas em duas ou mais subpopulações de células, uma das subpopulações sendo uma subpopulação enriquecida do primeiro tipo de célula;

[001795] (e) a determinação de um coeficiente de variação para a característica de emissão de fluorescência das células da subpopulação enriquecida para prover uma indicação da eficiência de separação para as condições de tingimento; e

[001796] (f) a determinação de modificar ou não qualquer condição de tingimento de acordo com a qual as células são tingidas ou a taxa R na qual as células tingidas são passadas através da localização de interrogação do citômetro de fluxo a fim de aperfeiçoar a eficiência de separação.

[001797] V2'. Processo, de acordo com a reivindicação V1', no qual a dita fração compreende uma primeira fração, e o dito conjunto de condições de tingimento compreende um primeiro conjunto de condições de tingimento, o processo adicionalmente compreendendo o tingimento de uma segunda fração da dita população de células de acordo com um segundo conjunto de condições de tingimento diferente do primeiro conjunto, e a execução das etapas (b) a (e) com a dita segunda fração da população de células.

[001798] V3'. Processo, de acordo com a reivindicação V2', no qual a segunda fração é tingida depois que o coeficiente de variação foi determinado para a primeira fração.

[001799] V4'. Processo, de acordo com a reivindicação V2', no qual o segundo conjunto de condições de tingimento difere do primeiro conjunto de condições de tingimento por pelo menos um dos seguintes

itens: (1) a concentração do corante fluorescente; (2) o comprimento de um período de tingimento usado para tingir as células; e (3) uma temperatura das células durante um período de tingimento usado para tingir as células.

[001800] V5'. Processo, de acordo com a reivindicação V2', que adicionalmente compreende o tingimento de uma terceira fração da dita população de células de acordo com um terceiro conjunto de condições de tingimento diferente dos primeiro e segundo conjuntos, e a execução das etapas de (b) a (e) com a terceira fração da população de células.

[001801] V6'. Processo, de acordo com a reivindicação V5', que adicionalmente compreende o tingimento de uma quarta fração da dita população de células de acordo com um quarto conjunto de condições de tingimento diferente dos primeiro, segundo e terceiro conjuntos, e a execução das etapas de (b) a (e) com a quarta fração da população de células.

[001802] V7'. Método, de acordo com a reivindicação V6', que adicionalmente compreende o tingimento de uma quinta fração da dita população de células de acordo com um quinto conjunto de condições de tingimento diferente dos primeiro, segundo, terceiro e quarto conjuntos, e a execução das etapas de (b) a (e) com a quinta fração da população de células.

[001803] V8'. Processo, de acordo com a reivindicação V2', que adicionalmente compreende a variação seletiva das condições no primeiro conjunto de condições de tingimento com base na dita determinação a fim de se obter o segundo conjunto de condições de tingimento.

[001804] V9'. Processo, de acordo com a reivindicação V2', no qual uma condição de tingimento modificada conforme determinado pela execução da etapa (f) na segunda fração é aplicada ao tingimento do restante da população de células.

[001805] V10'. Processo, de acordo com a reivindicação V1', no qual múltiplas frações de células são tingidas na etapa (a), cada fração sendo tingida de acordo com um conjunto exclusivo de condições de tingimento, onde as etapas de (b) a (e) são executadas para cada fração, e no qual a etapa (f) compreende o uso dos respectivos coeficientes de variação para determinar o conjunto de condições de tingimento a ser usado para se tingir células adicionais na dita população.

[001806] V11'. Processo, de acordo com a reivindicação V1', no qual as células são células de esperma.

[001807] V12'. Processo, de acordo com a reivindicação V11', no qual o primeiro tipo de célula compreende células de esperma conduzindo cromossomos X

[001808] V13'. Processo, de acordo com a reivindicação V1', no qual a etapa (a) compreende o tingimento das células com corante Hoechst 33342.

[001809] V14'. Processo, de acordo com a reivindicação V1', no qual a dita característica de emissão de fluorescência compreende uma característica de uma forma de onda de pulso de fluorescência que corresponde ao movimento de uma célula através da localização de interrogação, e no qual a dita característica é indicativa de pelo menos um dos seguintes itens: (1) intensidade de fluorescência total; e (2) intensidade de fluorescência de pico.

[001810] V15'. Processo, de acordo com a reivindicação V1', que adicionalmente compreende a determinação, antes da etapa (f), de se o coeficiente de variação da etapa (e) é igual ou menor que um coeficiente predeterminado de variação, e a repetição das etapas de (a) a (e) com o uso de um conjunto diferente de condições de tingimento para tingir uma fração diferente das células cada vez até que o coeficiente de variação determinado na etapa (e) seja igual ou menor que o coeficiente de variação predeterminado, e no qual a etapa (f) compre-

ende a determinação de usar as condições de tingimento para tingir células adicionais, se o coeficiente de variação da etapa (e) para as respectivas condições de tingimento for igual ou menor que o coeficiente de variação predeterminado.

[001811] V16'. Processo para avaliar um conjunto de condições para tingir uma população de células para separação, a população compreendendo um primeiro tipo e um segundo tipo de célula, o processo compreendendo:

[001812] (a) o tingimento de uma fração da população de células com um corante fluorescente de acordo com um conjunto de condições de tingimento;

[001813] (b) a exposição das células tingidas à radiação eletromagnética à medida que as células tingidas são passadas através de uma localização de interrogação de um citômetro de fluxo em uma taxa R;

[001814] (c) a determinação de uma característica de emissão de fluorescência das células expostas;

[001815] (d) o uso da característica de emissão de fluorescência determinada para classificar as células expostas em duas ou mais subpopulações de células, uma das subpopulações sendo uma subpopulação enriquecida do primeiro tipo de célula;

[001816] (e) a determinação de um coeficiente de variação para a característica de emissão de fluorescência das células da subpopulação enriquecida para prover uma indicação de eficiência de separação para as condições de tingimento;

[001817] (f) a determinação de modificar ou não qualquer condição de tingimento de acordo com a qual a fração de células a ser tingida ou a taxa R na qual as células tingidas são passadas através da localização de interrogação do citômetro de fluxo a fim de aperfeiçoar a eficiência de separação; e

[001818] (g) a aplicação da condição de tingimento modificada do

restante da população de células.

[001819] V17'. Processo, de acordo com a reivindicação V16', que adicionalmente compreende a separação do restante da população de células em um citômetro de fluxo para se obter uma população de amostra enriquecida do primeiro tipo de célula.

[001820] V18'. Processo, de acordo com a reivindicação V16', no qual a dita fração compreende uma primeira fração e o dito conjunto de condições de tingimento compreende um primeiro conjunto de condições de tingimento, o processo adicionalmente compreendendo o tingimento de uma segunda fração da dita população de células de acordo com um segundo conjunto de condições de tingimento diferente do primeiro conjunto, e a execução das etapas de (b) a (e) com a dita segunda fração da população de células.

[001821] V19'. Processo, de acordo com a reivindicação V18'', no qual a segunda fração é tingida depois que o coeficiente de variação foi determinado para a primeira fração.

[001822] V20'. Processo, de acordo com a reivindicação V18', no qual o segundo conjunto de condições de tingimento difere do primeiro conjunto pelo menos em um dos seguintes itens: (1) a concentração do corante fluorescente; (2) a duração de um período de tingimento usado para tingir as células; e (3) a temperatura das células durante um período de tingimento usado para tingir as células.

[001823] V21'. Processo, de acordo com a reivindicação V18', que adicionalmente compreende o tingimento de uma terceira fração da dita população de células de acordo com um terceiro conjunto de condições de tingimento diferente do primeiro e segundo conjuntos, e a execução das etapas de (b) a (f) com a terceira fração da população de células.

[001824] V22'. Processo, de acordo com a reivindicação V21', que adicionalmente compreende o tingimento de uma quarta fração da dita

população de células de acordo com um quarto conjunto de condições de tingimento diferente do primeiro, segundo, e terceiro conjuntos, e a execução das etapas de (b) a (f) com a quarta fração da população de células.

[001825] V23'. Processo, de acordo com a reivindicação V22', que adicionalmente compreende o tingimento de uma quinta fração da dita população de células de acordo com um quinto conjunto de condições de tingimento diferente do primeiro, segundo, terceiro e quarto conjuntos e a execução das etapas de (b) a (f) com a quinta fração da população de células.

[001826] V24'. Processo, de acordo com a reivindicação V18', que adicionalmente compreende, antes da etapa (g), a seleção de um conjunto de condições de tingimento para uso na etapa (g) que resulta em um nível de coeficiente de variação para a característica de emissão de fluorescência que é igual ou menor que um coeficiente de variação predeterminado.

[001827] V25'. Processo, de acordo com a reivindicação V25', no qual o coeficiente de variação predeterminado é de cerca de 1,3% ou menos.

[001828] V26'. Processo, de acordo com a reivindicação V16', que adicionalmente compreende a determinação, antes da etapa (f), de se o coeficiente de variação da etapa (e) é igual ou menor que um coeficiente de variação predeterminado, e a repetição das etapas de (a) a (e) com o uso de um conjunto diferente de condições de tingimento para tingir uma fração diferente das células cada vez até que o coeficiente de variação determinado na etapa (2) seja igual ou menor que o coeficiente de variação predeterminado, e no qual a etapa (f) compreenderá a determinação de usar as condições de tingimento para tingir células adicionais, se o coeficiente de variação da etapa (e) para as respectivas condições de tingimento for igual ou menor que o coeficiente

ente de variação predeterminando.

[001829] V27'. Processo, de acordo com a reivindicação V16', no qual as células são células de esperma.

[001830] V28'. Processo, de acordo com a reivindicação V27', no qual o primeiro tipo de célula compreende células de esperma conduzindo cromossomos X.

[001831] V29'. Processo, de acordo com a reivindicação V16', no qual a etapa (a) compreende o tingimento das células com corante Hoechst 33342.

[001832] V30'. Processo, de acordo com a reivindicação V16', no qual a dita característica de emissão de fluorescência compreende uma característica de uma forma de onda de pulso de fluorescência que corresponde ao movimento de uma célula através da localização de interrogação, e no qual a dita característica é indicativa de pelo menos um dos seguintes itens: (1) intensidade de fluorescência total; e (2) intensidade de fluorescência de pico.

W'. Calibração Automatizada Usando Sensores de Epi-iluminação

[001833] W1'. Aparelho para automaticamente calibrar um citômetro de fluxo de separação de gotículas que seletivamente aplica ou não um conjunto de uma ou mais cargas elétricas a uma pluralidade de gotículas à medida que elas se rompem de um fluxo de fluido contínuo em uma localização de ruptura de gotículas e que eletrostaticamente separa as partículas em dois ou mais fluxos de gotículas separados, a seleção da carga elétrica para cada gotícula sendo dependente dos conteúdos esperados da gotícula com base em um ajuste de retardamento de gota que representa uma estimativa do tempo que decorre entre o momento em que uma partícula contida no fluxo de fluido contínuo é detectada em uma localização de interrogação do citômetro de fluxo e a chegada dessa partícula na localização de ruptura de gotículas, o aparelho compreendendo:

[001834] (a) um sensor de epi-iluminação a jusante da localização de interrogação para iluminar gotículas em um dos ditos fluxos de gotículas separados, detectar quaisquer emissões de fluorescência emitidas pelas partículas contidas nas gotículas, e gerar um sinal de saída representativo das emissões de fluorescência detectadas; e

[001835] (b) um controle operável para analisar o sinal de saída e para automaticamente ajustar pelo menos um dos seguintes itens: (1) o ajuste de retardamento de gota; e (2) a amplitude de uma carga no dito conjunto de cargas.

[001836] W2'. Aparelho de W1', no qual o controle ajusta o ajuste de retardamento de gota como uma função da diferença entre as emissões de fluorescência detectadas e as emissões de fluorescência que teriam sido produzidas pelas gotículas apresentando os conteúdos esperados.

[001837] W3'. Aparelho de W1', no qual o controle ajusta a amplitude de uma carga no dito conjunto de cargas como uma função da variação em uma intensidade de pico média de emissões de fluorescência detectadas para gotículas contendo partículas fluorescentes.

[001838] W4'. Aparelho de W1', no qual o dito sensor de epi-iluminação compreende uma fonte de luz, um filtro dicróico, um sistema de lente, e um fotodetector.

[001839] W5'. Aparelho de W4', no qual o sensor de epi-iluminação adicionalmente compreende um cabo de fibra óptica operável para conduzir luz da fonte de luz para a localização na qual o sensor ilumina as gotículas.

[001840] W6'. Aparelho de W5', no qual o campo elétrico é gerado por um par de placas defletoras eletricamente carregadas, e no qual o sensor de epi-iluminação é posicionado para iluminar as ditas gotículas à medida que elas passam entre as ditas placas defletoras.

[001841] W7'. Aparelho de W6', no qual o sensor de epi-iluminação é

posicionado para iluminar as ditas gotículas através de um orifício em um suporte eletricamente isolado que prende pelo menos uma das placas defletoras à medida que as gotículas se movem através de um campo elétrico gerado por uma ou mais das placas defletoras.

[001842] W8'. Aparelho de W4', no qual a fonte de luz é operável para iluminar partículas na localização de interrogação.

[001843] W9'. Aparelho de W1', que adicionalmente compreende um sensor de epi-iluminação, de acordo com o parágrafo (a) da reivindicação W1', para cada do restante dos ditos dois ou mais fluxos de gotículas separados, o dito controle sendo operável para analisar os sinais de saída originário do sensor de epi-iluminação para cada fluxo de gotícula e para automaticamente ajustar pelo menos um dos seguintes itens: (1) o ajuste de retardamento de gota como uma função da diferença entre as emissões de fluorescência detectadas para um ou mais dos fluxos e as emissões de fluorescência que teriam sido produzidas pelas gotículas apresentando os conteúdos esperados no respectivo fluxo de gotículas; e (2) a amplitude de uma carga no dito conjunto de cargas como uma função da variação em uma intensidade de pico média de emissões de fluorescência detectada para gotículas contendo partículas fluorescentes em pelo menos um dito ou mais fluxos de gotículas.

[001844] W10'. Aparelho de W9', no qual o campo elétrico é gerado por um par de placas defletoras eletricamente carregadas, e no qual o sensor de epi-iluminação é posicionado para iluminar as ditas gotículas à medida que elas passam entre as ditas placas defletoras.

[001845] W11'. Aparelho de W10', no qual o sensor de epi-iluminação é posicionado para iluminar as ditas gotículas através de um orifício em um suporte eletricamente isolado que detém pelo menos uma das placas defletoras à medida que as gotículas se movem através de um campo elétrico gerado por uma ou mais placas defleto-

ras.

[001846] W12'. Aparelho de W1', no qual o controle é operável para automaticamente manter a fase de carregamento de gotículas dentro de cerca de 36 graus acima ou abaixo de uma ótima fase com relação à formação de gotícula.

[001847] W13'. Aparelho de W12', no qual o controle é operável para automaticamente manter a fase de carregamento de gotículas dentro de cerca de 10,8 graus acima ou abaixo de uma ótima fase com relação à formação de gotículas.

X'. Método de Calibração Automatizado

[001848] X1'. Método de continuamente verificar a calibração de separação apropriada em um citômetro de fluxo de separação de gotículas que seletivamente aplica ou não uma carga de um conjunto de uma ou mais cargas elétricas a uma pluralidade de gotículas à medida que elas são formadas a partir de um fluxo de fluido contínuo em uma localização de ruptura de gotícula e que eletrostaticamente separa as gotículas em dois ou mais fluxos de gotículas separados, a seleção da carga elétrica para cada gotícula sendo dependente dos conteúdos esperados da gotícula com base em um ajuste de retardamento de gota que representa uma estimativa do tempo que decorre entre o momento em que uma partícula contida no fluxo de fluido contínuo é detectada em uma localização de interrogação do citômetro de fluxo e a chegada dessa partícula na localização de ruptura de gotícula, o método compreendendo:

[001849] (a) a iluminação de gotículas em um dos ditos fluxos de gotículas separados com o direcionamento de um feixe de iluminação ao longo de um eixo de feixe em uma direção dianteira através de um sistema de lente para produzir a emissão de luz fluorescente por quaisquer partículas contidas nas gotículas;

[001850] (b) o uso do dito sistema de lente para coletar parte da dita

luz fluorescente e direcioná-la em uma direção traseira ao longo do eixo de feixe;

[001851] (c) a detecção de pelo menos parte da luz fluorescente coletada e a geração de um sinal de saída representativo da luz detectada; e

[001852] (d) a análise do sinal de saída e, com base na análise, o ajuste automático em pelo menos um dos seguintes itens: (1) o ajuste de retardamento de gota; e (2) a amplitude de uma carga no dito conjunto de cargas.

[001853] X2'. Método de X1', no qual a etapa de ajuste compreende o ajuste do ajuste de retardamento de gota como uma função da diferença entre as emissões de fluorescência detectadas e as emissões de fluorescência que teriam sido produzidas pelas gotículas apresentando os conteúdos esperados.

[001854] X3'. Método de X1', no qual a etapa de ajuste compreende o ajuste da amplitude de uma carga no dito conjunto de cargas como uma função da variação em uma intensidade de pico média de emissões de fluorescência detectadas para as gotículas contendo partículas fluorescentes.

[001855] X4'. Método de X1', no qual a etapa de iluminação compreende o uso de um cabo de fibra óptica para guiar a luz da fonte de luz para uma posição adjacente aos ditos fluxos de gotículas separados.

[001856] X5'. Método de X1', no qual o campo elétrico é gerado por um par de placas defletoras eletricamente carregadas, e no qual a etapa de iluminação compreende a iluminação de gotículas à medida que elas se movem entre as placas defletoras.

[001857] X6'. Método de X5', no qual pelo menos uma das placas defletoras é mantida em um suporte eletricamente isolado, e no qual a etapa de iluminação compreende a iluminação das gotículas através de um orifício no suporte à medida que as gotículas se movem através

do campo elétrico.

[001858] X7'. Método de X1', que adicionalmente compreende o uso da fonte de luz para iluminar as partículas na localização de interrogação.

[001859] X8'. Método de X1', que adicionalmente compreende a execução das etapas (a)-(c) para cada do restante dos ditos dois ou mais fluxos de gotículas, e no qual a etapa (d) adicionalmente compreende a análise de cada um dos respectivos sinais de saída e o ajuste de pelo menos um dos seguintes itens: (1) o ajuste de retardamento de gota como uma função da diferença entre as emissões de fluorescência detectadas e as emissões de fluorescência que teriam sido produzidas por gotículas apresentando os conteúdos esperados; e (2) a amplitude de uma carga no dito conjunto de cargas como uma função das variações na intensidade de pico média das emissões de fluorescência detectadas para gotículas contendo partículas fluorescentes em pelo menos um dos ditos fluxos de gotículas.

[001860] X9'. Método de X8', no qual o campo elétrico é gerado por um par de placas defletoras eletricamente carregadas, e no qual a etapa de iluminação compreende a iluminação de gotículas à medida que elas se movem entre as placas defletoras.

[001861] X10'. Método de X9', no qual pelo menos uma das placas defletoras é mantida por um suporte eletricamente isolado, e no qual a etapa de iluminação compreende a iluminação das gotículas através de orifícios no suporte à medida que as gotículas se movem através do campo elétrico.

Y'. Método de Calibração de Fluxo de Teste

[001862] Y1'. Método de continuamente verificar a calibração de separação adequada em um citômetro de fluxo de separação de gotículas que seletivamente aplica ou não uma carga de um conjunto de uma ou mais cargas elétricas a uma pluralidade de gotículas à medida

que elas são formadas de um fluxo de fluido contínuo em uma localização de ruptura de gotículas e que eletrostaticamente separa as gotículas em dois ou mais fluxos de gotículas separados, a seleção da carga elétrica para cada gotícula sendo dependente dos conteúdos esperados da gotícula com base em um ajuste de retardamento de gota que representa uma estimativa do tempo que decorre entre o momento em que uma partícula contida no fluxo de fluido contínuo é detectada em uma localização de interrogação do citômetro de fluxo e a chegada dessa partícula na localização de ruptura de partícula, o método compreendendo:

[001863] a seleção de gotículas estimadas para apresentar uma probabilidade substancialmente zero de conter uma partícula;

[001864] a aplicação de uma carga do dito conjunto de cargas às gotículas selecionadas a fim de formar um fluxo de teste fora das gotículas selecionadas;

[001865] a iluminação das gotículas no fluxo de teste; e

[001866] a detecção de qualquer luz emitida ou dispersada por quaisquer partículas nas gotículas selecionadas.

[001867] Y2', Método de Y1', que adicionalmente compreenderá o ajuste do ajuste de retardamento de gota, se a luz detectada na etapa de detecção exceder um nível limite.

[001868] Y3'. Método de Y2', no qual a etapa de ajuste é executada automaticamente.

[001869] Y4'. Método de Y1', no qual a carga aplicada na etapa de carregamento é uma carga neutra.

[001870] Y5'. Método de Y1', no qual as etapas de iluminação e de detecção são executadas com o uso de um sensor de epi-iluminação.

Z'. Sistema de Correção de Separação

[001871] Z1'. Sistema de correção de separação para um citômetro de fluxo de separação de gotícula, que compreende:

[001872] um elemento de carregamento para seletivamente aplicar uma carga elétrica originária de um conjunto de cargas elétricas a cada gotícula em um fluxo de gotículas à medida que as gotículas são formadas a partir de um fluxo de fluido contínuo em uma localização de ruptura de gotículas;

[001873] um par de placas defletoras eletricamente carregadas a jusante do elemento de carregamento posicionado de modo que as gotículas passem entre as placas defletoras para separar as gotículas de acordo com sua carga;

[001874] e um sistema de remoção de detritos que compreende pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um sistema de ar seletivamente ativável para remover detritos do elemento de carregamento; e (2) um sistema de ar seletivamente ativável para remover detritos das placas defletoras.

[001875] Z2'. Sistema de Z1', no qual o dito sistema de remoção de detritos compreende o elemento (1) e o elemento (2).

[001876] Z3'. Sistema de Z1', no qual o sistema de remoção de detritos é adaptado para ser automaticamente ativado por um processador com a determinação pelo processador de quais detritos das gotículas de dispersão estão interferindo com a separação de gotículas.

[001877] Z4'. Sistema de Z1', no qual o sistema de remoção de detritos compreende o elemento (1), e no qual o dito sistema de ar seletivamente ativável do elemento (1) compreende uma passagem de vácuo que apresenta uma abertura adjacente ao dito elemento de carregamento para eliminar por meio de vácuo os detritos do elemento de carregamento.

[001878] Z5'. Sistema de Z1', no qual o sistema de remoção de detritos compreende o elemento (2), e no qual o dito sistema de ar seletivamente ativável do elemento (2) compreende as passagens de ar apresentando aberturas através das quais o gás comprimido é dispen-

sado para eliminar os detritos das placas defletoras.

[001879] Z6'. Método de operar um sistema de citômetro de fluxo de separação de gotículas, o método compreendendo:

[001880] o uso de um elemento de carregamento para seletivamente aplicar uma carga elétrica originária de um conjunto de cargas elétricas a cada gotícula em um fluxo de gotículas à medida que as gotículas são formadas a partir de um fluxo de fluido contínuo em uma localização de ruptura de gotículas;

[001881] a passagem das gotículas entre um par de placas defletoras eletricamente carregadas a jusante do elemento de carregamento para separar as gotículas de acordo com sua carga;

[001882] o uso de um processador para determinar se os detritos estão ou não interferindo com a separação de gotículas; e

[001883] a remoção dos ditos detritos com o uso de um sistema de remoção de detritos de acordo com o controle do processador, se o processador determinar quais detritos estão interferindo com a separação de gotícula, o dito sistema de remoção de detritos compreendendo pelo menos um dos seguintes elementos: (1) um sistema de ar seletivamente ativável para remover detritos do elemento de carregamento; e (2) um sistema de ar seletivamente ativável para remover os detritos das placas defletoras.

RESERVA DE DIREITOS

[001884] As requerentes expressamente retêm todos os direitos com relação ao depósito de reivindicações emendadas e continuação e/ou pedidos divisionais em qualquer país designado a processar as reivindicações dirigidas a qualquer aspecto da invenção acima identificado e qualquer outro assunto descrito na especificação ou mostrado nos desenhos.

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema para separar uma mistura de partículas tingidas incluindo partículas tingidas apresentando uma característica A e partículas tingidas apresentando uma característica B, sendo que o dito sistema é caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente incluem uma série de pulsos de forma de onda (497), no qual os ditos pulsos de forma de onda (497) são indicativos da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada, onde o processador de sinal digital (865) inclui instruções para detectar os pulsos de forma de onda (497) correspondente à informação digital (707), instruções para extrair características nos pulsos de forma de onda (497) detectados e instruções para discriminar os pulsos de forma de onda (497) detectados em função de suas características extraídas.

2. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) detecta partes da informação digital (707) correspondente aos pulsos de forma de onda (497) e classifica as porções detectadas, e onde o processador de sinal digital (865) fornece o sinal de separação (853) como uma função das ditas porções detectadas e classificadas.

3. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as partículas são células e as características A e B se relacionam com características físicas das células.

4. Sistema, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que as partícula tingidas são células de esperma tingidas, e a característica A é indicativo de uma célula de esperma X viva e a partícula de característica B é indicativo de algo diferente de uma célula de esperma X viva ($\sim X$).

5. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o percurso de fluxo é formado para conter partículas seguidas, geralmente, uma após a outra em uma série que inclui sequências de gotículas, incluindo as primeiras gotículas, cada uma incluindo uma ou mais partículas apresentando a característica A, segunda gotícula, cada uma incluindo uma ou mais partículas apresentando a característica B, e a terceira gotícula, cada uma

incluindo duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresenta a característica A e pelo menos uma das quais apresenta a característica B.

6. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o sistema de separação (119) é um sistema de separação de gotículas (119), ou um sistema de separação por fotodeterioração (1351), ou um sistema de separação de ligação de fluido (1357).

7. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) apresenta um processador de detecção de pulso (865) para detectar pulsos de forma de onda (497) representados pela informação digital (707), e no qual o dito processador de sinal digital (865) classifica a informação digital (707) como uma função dos pulsos de forma de onda detectados (497).

8. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) apresenta um processador de separação (873) que responde à classificação para fornecer os sinais de separação para o sistema de separação (119).

9. Sistema, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o processador de separação (873) enumera o número de partículas classificadas que apresentam a característica A ou apresentam a característica B.

10. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a fonte de radiação eletromagnética (25) compreende ainda um dispositivo de iluminação pulsado (3001).

11. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) extrai características dos pulsos de forma de onda (497) correspondentes à informação digital (707) e fornece o sinal de

separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função das características extraídas.

12. Sistema, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) apresenta um processador de detecção de pulsos (865) para detectar pulsos de forma de onda (497) representados pela informação digital (707) e para classificar os pulsos de forma de onda (497) detectados e a saída de variação de tempo inclui os pulsos de forma de onda (497), em que os pulsos de forma de onda (497) e as informações digitais (707) correspondentes são indicativos da característica A ou da característica B e um processador de sinal digital (865) discrimina a informação digital (707) como indicativa da característica A ou como indicativa da característica B e fornece um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) discriminada.

13. Sistema, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que os recursos extraídos correspondem a uma ou mais das seguintes características: área de pulso (753) , pico de pulso (755), área interna de pulso, largura de pulso, gaussianidade de pulso, pico de retardamento de pulso ou grau de inclinação de pulso.

14. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente são indicativos da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação (707) digital analisada e classificada, onde o processador de sinal digital (865) inclui instruções para detectar os pulsos de forma de onda correspondente à informação digital (707), instruções para extrair características nos pulsos detectados e instruções para definir um limite de decisão (763) que discrimina entre as características extraídas que representam a característica A e as características extraídas que representam a característica B.

15. Sistema, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) ajusta a relativa localização do limite de decisão (763) com relação às

características extraídas que representam a característica A e em relação às características extraídas que representam a característica B como função de pelo menos um dos seguintes itens:

(a) a pureza de pelo menos uma da dita população com relação ou às partículas de característica A ou às partículas de característica B; e

(b) a quantidade de partículas de característica A ou de partículas de característica B em pelo menos uma dita população com relação à quantidade total de partículas de características A ou de partículas de característica B no dito fluxo.

16. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para

amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente são indicativos da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada, onde o processador de sinal digital (865) inclui um processador de gerenciamento de dados para reunir a informação digital (707) em um fluxo contínuo.

17. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo

menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente são indicativos da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada, onde o processador de sinal digital (865) inclui um processador de detecção de pulso (865) para detectar pulsos de forma de onda (497) representada pela informação digital (707), e por o processador de sinal digital (865) classificar a informação digital (707) como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A ou como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B.

18. Sistema para separar uma mistura de partículas tingidas, incluindo partículas tingidas apresentando uma característica A e partículas tingidas apresentando uma característica B, sendo que o dito sistema é caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo

de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), em que a saída analógica de variação no tempo (701) e as informações digitais (707) correspondentes são indicativas da característica A ou característica B, onde o conversor do analógico para digital (689) compreende ainda uma taxa de amostragem contínua;

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada; e

(h) um filtro para filtrar a saída analógica em uma frequência igual ou menor que metade da taxa de amostragem contínua do conversor do analógico para digital (689), no qual o conversor do analógico para digital (689) converte a saída analógica filtrada em informação digital (707) correspondente, e no qual o dito processador de sinal digital (865) classifica a informação digital (707)

como uma função de um limite de discriminação.

19. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), em que a saída analógica de variação no tempo (701) e as informações digitais (707) correspondentes são indicativas da característica A ou característica B, onde o conversor do analógico para digital (689) compreende ainda uma taxa de amostragem contínua;

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e

classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada; e

(h) um filtro para filtrar a saída analógica em uma frequência igual ou menor do que a metade da taxa de amostragem contínua do conversor e, no qual o dito o conversor converte a saída analógica filtrada em informações digitais (707) correspondentes.

20. Sistema, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) classifica a informação digital (707) como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas que apresentam característica A ou como uma função de um coeficiente de variação de uma população de partículas que apresentam característica B.

21. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), na qual a saída analógica de variação no tempo (701) e as informações digitais (707) correspondentes são indicativas da característica A ou característica B, sendo que o conversor do analógico para digital (689) compreende ainda uma taxa de amostragem contínua e no qual a dita taxa de amostragem contínua é de cerca de 105 MHz ou mais; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada.

22. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com

as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente são indicativos da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada, onde o processador de sinal digital (865) inclui um processador de extração e discriminação (867) de características para definir um limite de decisão (763) que discrimine entre as características extraídas que representam as características A e as características extraídas que representam as características B, e que o processador de extração e discriminação de características (867) extrai características representadas pela informação digital (707) e classifica as características como uma função do limite de decisão (763).

23. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente são indicativos da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada, onde o processador de sinal digital (865) inclui um processador de extração e discriminação de características (867) para definir um limite de decisão (763) que discrimine entre as características extraídas que representam as características A e as características extraídas que representam as características B, e que o processador de extração e discriminação de

características (867) extrai características representadas pela informação digital (707) e classifica as características como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando característica A ou como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B.

24. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente são indicativos da

característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada, onde o processador de sinal digital (865) classifica a informação digital (707) como uma função de minimizar um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A como sendo substancialmente igual ou menor do que uma quantidade preestabelecida ou como uma função de minimizar um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B como sendo substancialmente igual ou menor que uma quantidade preestabelecida.

25. Sistema, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a quantidade preestabelecida é de cerca de 1,5% ou menos, ou é de cerca de 1,3% ou menos.

26. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas

apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente são indicativos da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada, onde o dito processador de sinal digital (865) classifica a informação digital (707), de tal modo que uma população das partículas apresentando a característica A e uma população das partículas apresentando a característica B correspondam a um modelo de computador de três populações incluindo uma primeira população de modelo de partículas apresentando a característica A, uma segunda população de modelo de partículas apresentando a característica B, e uma terceira população de modelo de partículas não alinhadas, o dito modelo estimando a estatística de população para cada uma das primeiras, segunda e terceira populações de modelo.

27. Sistema, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o terceiro modelo de população inclui duas populações de partículas desalinhadas, e no qual o modelo estima a estatística população para as duas populações de partículas

desalinhas.

28. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente são indicativos da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da

informação digital (707) analisada e classificada, onde o processador de sinal digital (865) determina informações das características anteriormente conhecidas da saída analógica de variação de tempo (701) a partir da informação digital (707); detecta pulsos de forma de onda (497) representados pela informação digital (707) como uma função das informações características anteriormente determinadas; e fornece um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função dos pulsos de forma de onda (497) detectados.

29. Sistema, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) emprega um procedimento iterativo para determinar um limiar de detecção de pulso para definir as características anteriormente conhecidas, o procedimento iterativo inclui:

(a) a computação de estimativas de estatísticas anteriormente conhecidas a partir da informação digital (707); uso das estimativas calculadas para aplicar uma lógica de detecção de pulso à dita informação digital (707) a fim de identificar pulsos indicativos da característica A ou da característica B; e

(b) recomputar as estimativas sem o uso da informação digital (707) que corresponde aos pulsos identificados; e a repetição do procedimento acima até que as estimativas de estatísticas anteriormente conhecidas converjam ou que um número máximo fixo de iterações ocorra.

30. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar

emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente são indicativos da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada, onde o processador de sinal digital (865) gera parâmetros de discriminação iniciais a partir da informação digital (707), discriminando a informação digital (707) como uma função dos parâmetros de discriminação iniciais, e provendo um sinal de separação (853) para o dito sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) discriminada.

31. Sistema, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) emprega pelo menos um dos seguintes algoritmos para gerar os parâmetros de discriminação inicial: Meio k, Meio k Vago e Hierárquico Aglomerativo.

32. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente são indicativos da

característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada, onde o processador de sinal digital emprega um limite de detecção para definir pulsos de forma de onda (497) correspondentes à informação digital (707), e onde o dito limite de detecção é uma função de uma estimativa média de conhecimentos anteriores e de um desvio padrão da informação digital (707) computada dentro de uma janela móvel de amostras termina com a amostra atual.

33. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de distribuição de fluido (15) para fornecer um fluido contendo as partículas tingidas em um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitação de emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas que possuem a característica A e as partículas tingidas que possuem com a característica B no percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar as emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31), ou como partículas possuindo características A ou partículas possuindo a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para classificar as partículas tingidas de acordo com sua classificação para proporcionar pelo menos uma população contendo os itens desejados;

(f) um conversor de analógico para digital (689) para amostragem de uma saída analógica variável no tempo (701) do

fotodetector (117) e fornecendo uma saída incluindo informação digital (707) correspondente à saída analógica variável no tempo (701) onde a saída analógica variável no tempo (701) e as informações digitais (707) correspondentes são indicativas da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada; e

(h) um controle digital que emprega uma análise de detecção de anomalia estatística, onde a informação digital (707) estatisticamente anômala das características de conhecimentos anteriores da informação digital (707) é considerada parte de um pulso digital.

34. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação no tempo (701) e as informações digitais (707) correspondentes são indicativas da característica A ou da característica B, e em que a fonte de radiação eletromagnética (25) compreende ainda um dispositivo de iluminação pulsado (3001) em sincronização com a amostragem do conversor do analógico para digital (689) para amostragem síncrona para iluminar as partículas para produzir os pulsos de forma de onda (497) correspondentes; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada.

35. Sistema, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um sistema de dispensa de fluido (15) para dispensar um fluido contendo as partículas tingidas ao longo de um percurso de fluxo;

(b) uma fonte de radiação eletromagnética (25) para excitar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas de característica A e das partículas tingidas de característica B ao longo de um percurso de fluxo;

(c) um fotodetector (117) para detectar emissões de fluorescência (31) das partículas tingidas;

(d) um processador (131) em comunicação com o fotodetector (117) para classificar as partículas tingidas de acordo com as suas emissões de fluorescência (31) ou como partículas tingidas apresentando a característica A, ou como partículas apresentando a característica B;

(e) um sistema de separação (119) para separar as partículas tingidas de acordo com a classificação para fornecer pelo menos uma população contendo as partículas desejadas;

(f) um conversor do analógico para o digital (689) para amostragem de uma saída analógica de variação de tempo (701) do fotodetector (117) e proporciona uma saída que inclui informação digital (707) correspondente à saída analógica de variação de tempo (701), onde a saída analógica de variação de tempo (701) e a informação digital (707) correspondente incluem são indicativos da característica A ou característica B; e

(g) um processador de sinal digital (865) para analisar e classificar a informação digital (707) e fornecer um sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função da informação digital (707) analisada e classificada, onde o processador de sinal digital (865) extrai as características de pulsos de forma de onda (497) correspondentes à informação digital (707) e fornece o sinal de separação (853) para o sistema de separação (119) como uma função das características extraídas, e sendo que as características extraídas compreendem uma aproximação de um derivativo do pulso ou do grau de inclinação do pulso em um ponto do pulso com relação a uma altura média de pico média do pulso.

36. Sistema, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o ponto ao longo do pulso corresponde a um ponto em que há uma diferença entre um primeiro derivativo de um pulso produzido por partículas apresentando a característica A e

um primeiro derivativo de um pulso produzido por partículas apresentando a características B.

37. Sistema, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a saída analógica de variação de tempo (701) corresponde a um pulso de emissão de fluorescência (497) das partículas, e no qual o dito ponto ao longo do pulso:

(a) ou corresponde a um ponto no qual uma diferença entre um primeiro derivativo de um pulso produzido por partículas apresentando a característica A e um primeiro derivativo de um pulso produzido por partículas apresentando a característica B está em um máximo ou próximo deste; ou

(b) é uma função de uma altura de pico dos pulsos de emissão de fluorescência (497).

38. Sistema, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) inclui instruções para:

(a) a detecção dos pulsos de forma de onda (497) representados pela informação digital (707);

(b) a extração das características nos pulsos de forma de onda (497) detectados;

(c) a discriminação dos pulsos de forma de onda (497) detectados como uma função de suas características extraídas; e

(d) a definição de um limite de decisão (763) que discrimina entre as características extraídas que representam a característica A e as características extraídas que representam a característica B.

39. Sistema, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o processador de sinal digital (865) compreende ainda instruções para extrair características dos pulsos de forma de onda (497) detectados e para discriminar os pulsos de forma de onda (497) detectados em função de suas características

extraídas.

40. Método para separar uma mistura de partículas tingidas, incluindo partículas tingidas apresentando uma característica A e partículas tingidas apresentando uma característica B, como definida na reivindicação 1, sendo que o dito método é caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

(a) a formação de uma corrente contendo as partículas tingidas (23);

(b) a geração de uma saída analógica com um fotodetector (117) que detecta partículas tingidas na corrente;

(c) a amostragem da saída analógica do fotodetector (117) com um conversor de analógico para digital (689) e gerando informações digitais (707) correspondentes na qual a saída analógica é indicativa da característica A ou da característica B;

(d) a análise e a classificação da informação digital (707), em que a etapa de análise e classificação compreende ainda a detecção de pulsos de forma de onda (497) representados pela informação digital (707), extraíndo características dos pulsos de forma de onda (497) a partir da informação digital (707) e discriminando os pulsos de forma de onda (497) detectados em função de suas características extraídas;

(e) a separação das partículas tingidas como uma função da informação digital (707) analisada e classificada; e

(f) a coleta das partículas separadas (57) para proporcionar uma população contendo partículas tingidas que apresentam a característica A e/ou uma população contendo partículas tingidas que apresentam a característica B.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que as partículas são células e as características A e B se relacionam com características físicas das

células.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que as partículas são células de esperma e a característica A é indicativa de um cromossomo X vivo referente à uma célula de esperma e a partícula de característica B é indicativa de algo diferente de um cromossomo X vivo referente à célula (~X).

43. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de formação da corrente (23) para conter partículas seguidas, geralmente, uma após a outra em uma série que inclui sequências de gotículas, incluindo as primeiras gotículas, cada uma incluindo uma ou mais partículas apresentando a característica A, segunda gotícula, cada uma incluindo uma ou mais partículas apresentando a característica B, e a terceira gotícula, cada uma incluindo duas ou mais partículas estritamente espaçadas, pelo menos uma das quais apresenta a característica A e pelo menos uma das quais apresenta a característica B.

44. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a etapa de separação usa um sistema de separação de gotículas (119), ou um sistema de separação por fotodeterioração (1351), ou um sistema de separação de ligação de fluido (1357).

45. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de definição de um limite de decisão (763) que discrimine entre as características extraídas que representam as características A e as características extraídas que representam as características B.

46. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a etapa de amostragem da saída analógica do fotodetector (117) compreende ainda a amostragem

síncrona da saída analógica do fotodetector (117).

47. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a etapa de classificar a informação digital (707) compreende ainda classificar a informação digital (707) como função de minimizar um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica A como sendo substancialmente igual ou menor que uma quantidade preestabelecida ou como uma função de minimizar um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B como sendo substancialmente igual ou menor do que uma quantidade preestabelecida.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato que a quantidade preestabelecida é de cerca de 1,5% ou menos.

49. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato que a etapa de classificação da informação digital (707) inclui a classificação da informação digital (707), de tal modo que uma população das partículas apresentando a característica A e uma população das partículas apresentando a característica B correspondam a um modelo de computador de três populações incluindo uma primeira população de modelo de partículas apresentando a característica A, uma segunda população de modelo de partículas apresentando a característica B, e uma terceira população de modelo de partículas não alinhadas, o dito modelo estimando a estatística de população para cada uma das primeira, segunda e terceira populações de modelo.

50. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato que a etapa de classificação da informação digital (707) compreende ainda classificar a informação digital (707) como uma função de um coeficiente de variação de uma população

das partículas apresentando a característica A ou como uma função de um coeficiente de variação de uma população das partículas apresentando a característica B.



FIG. 2

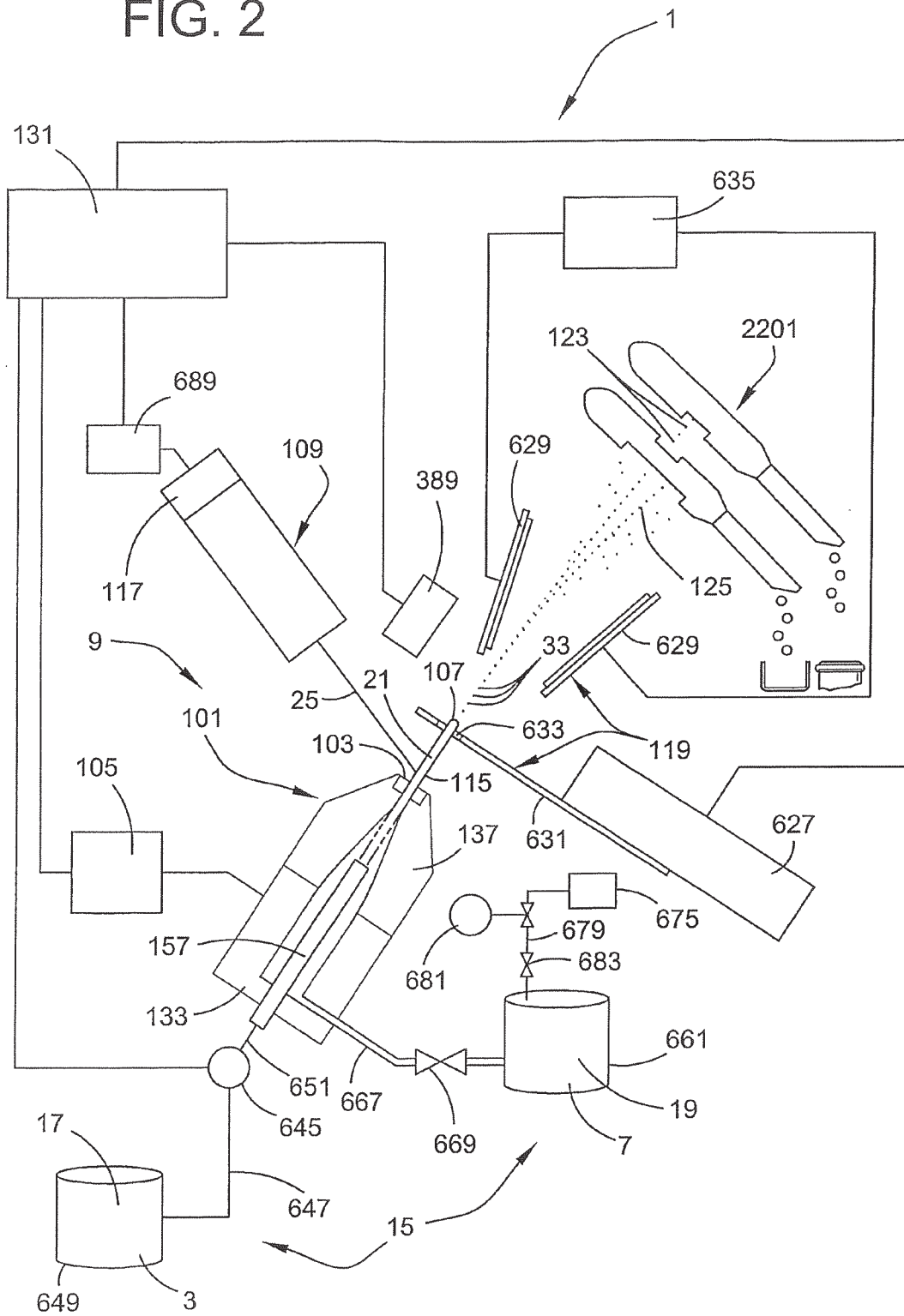
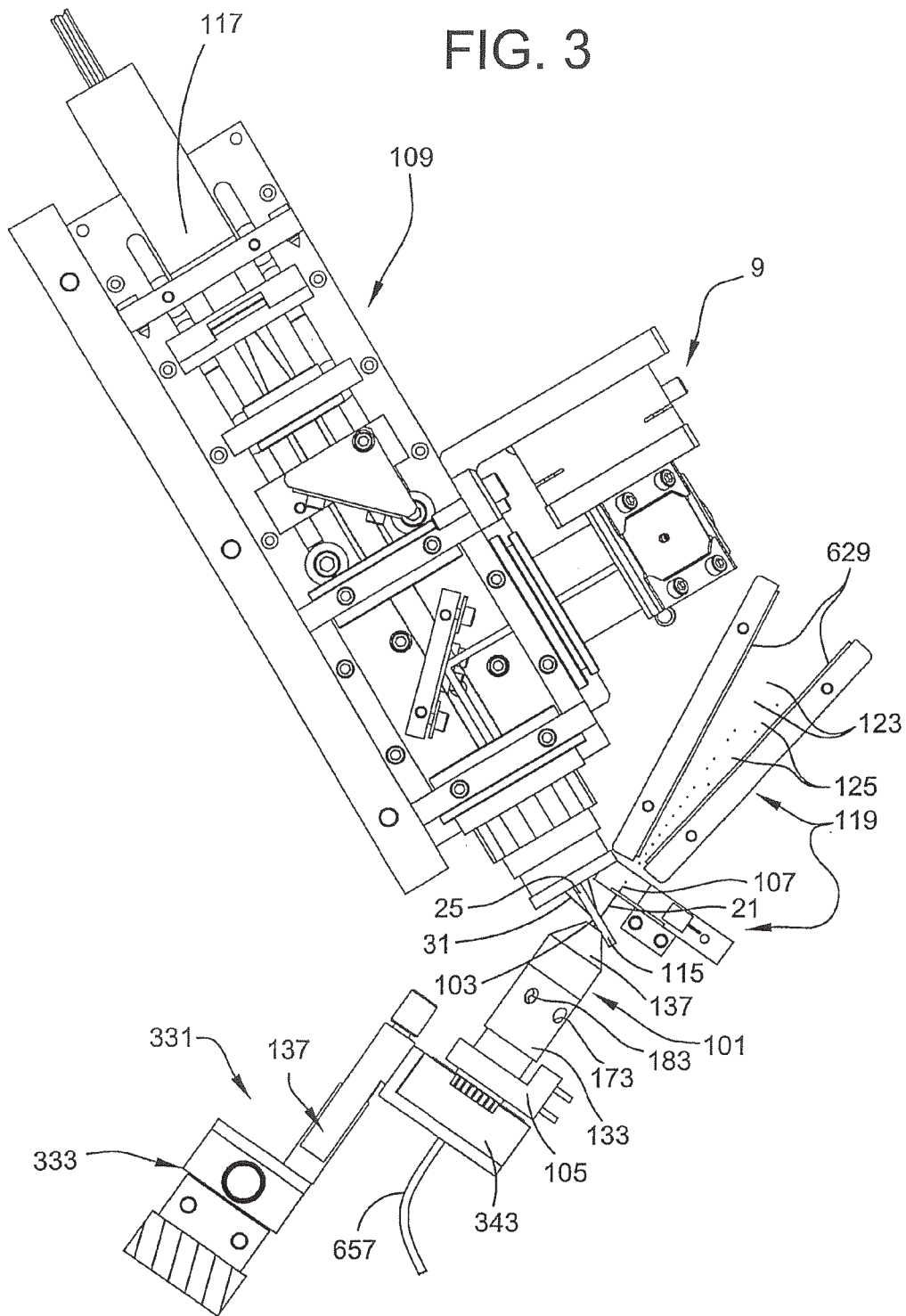


FIG. 3



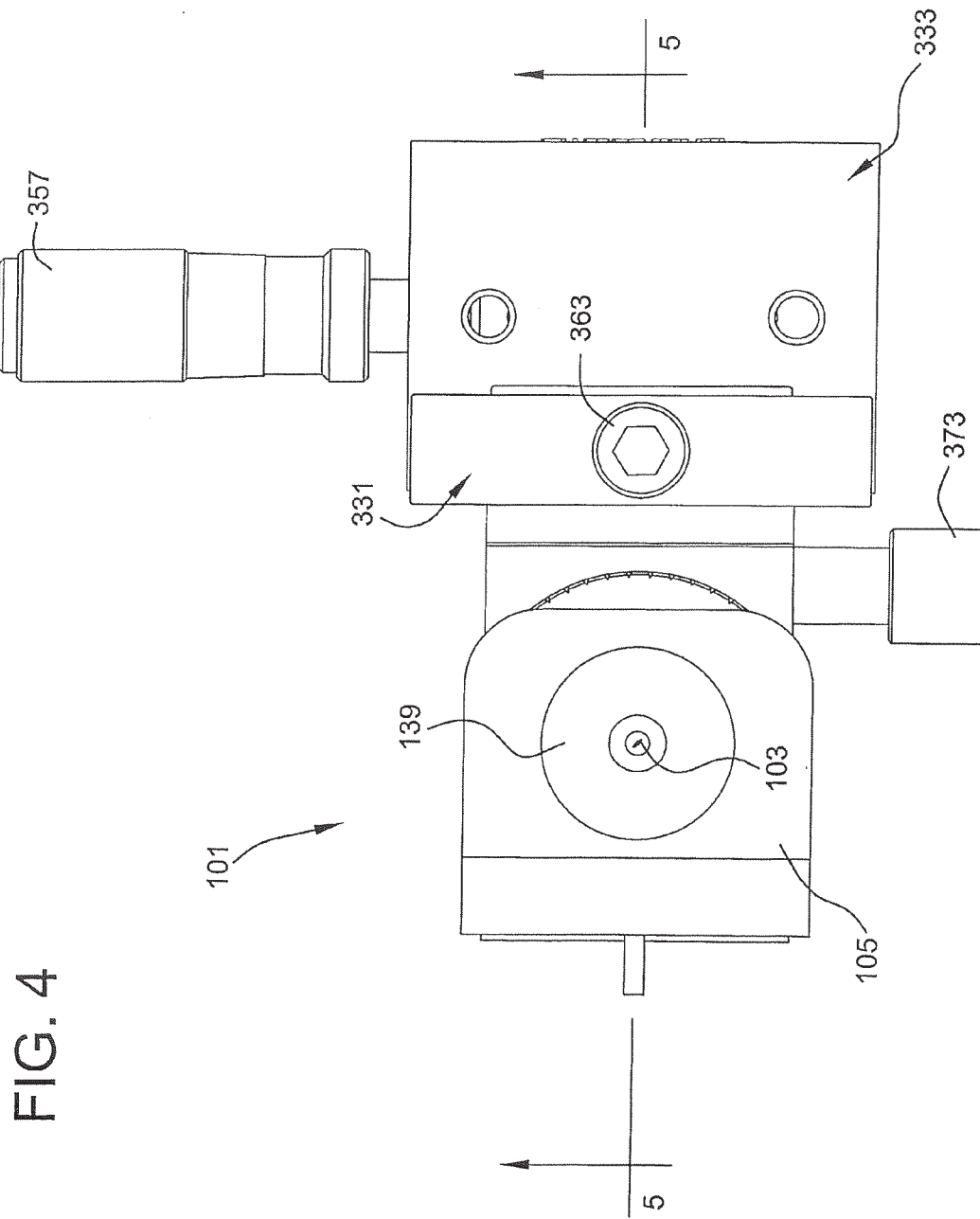
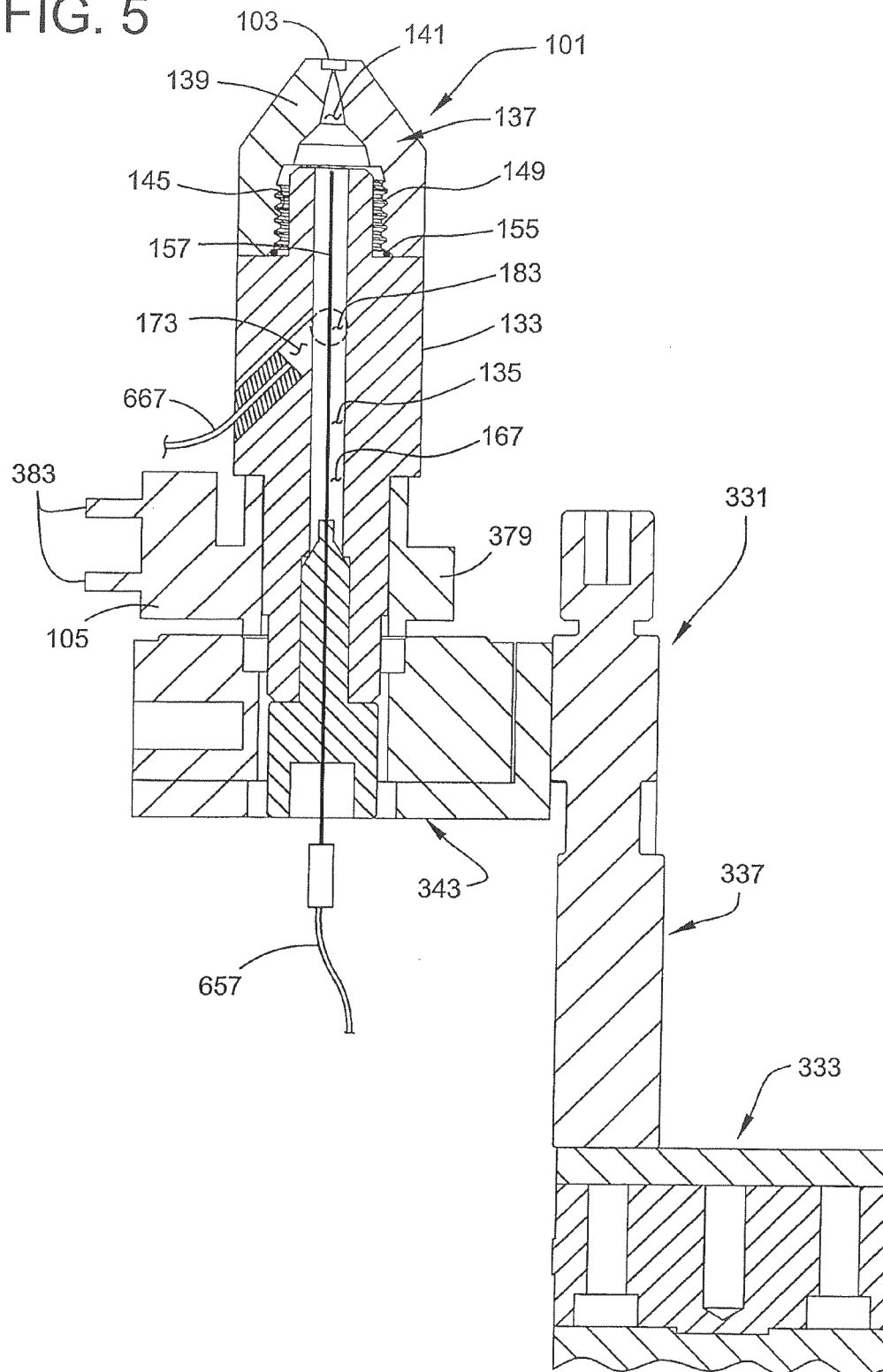
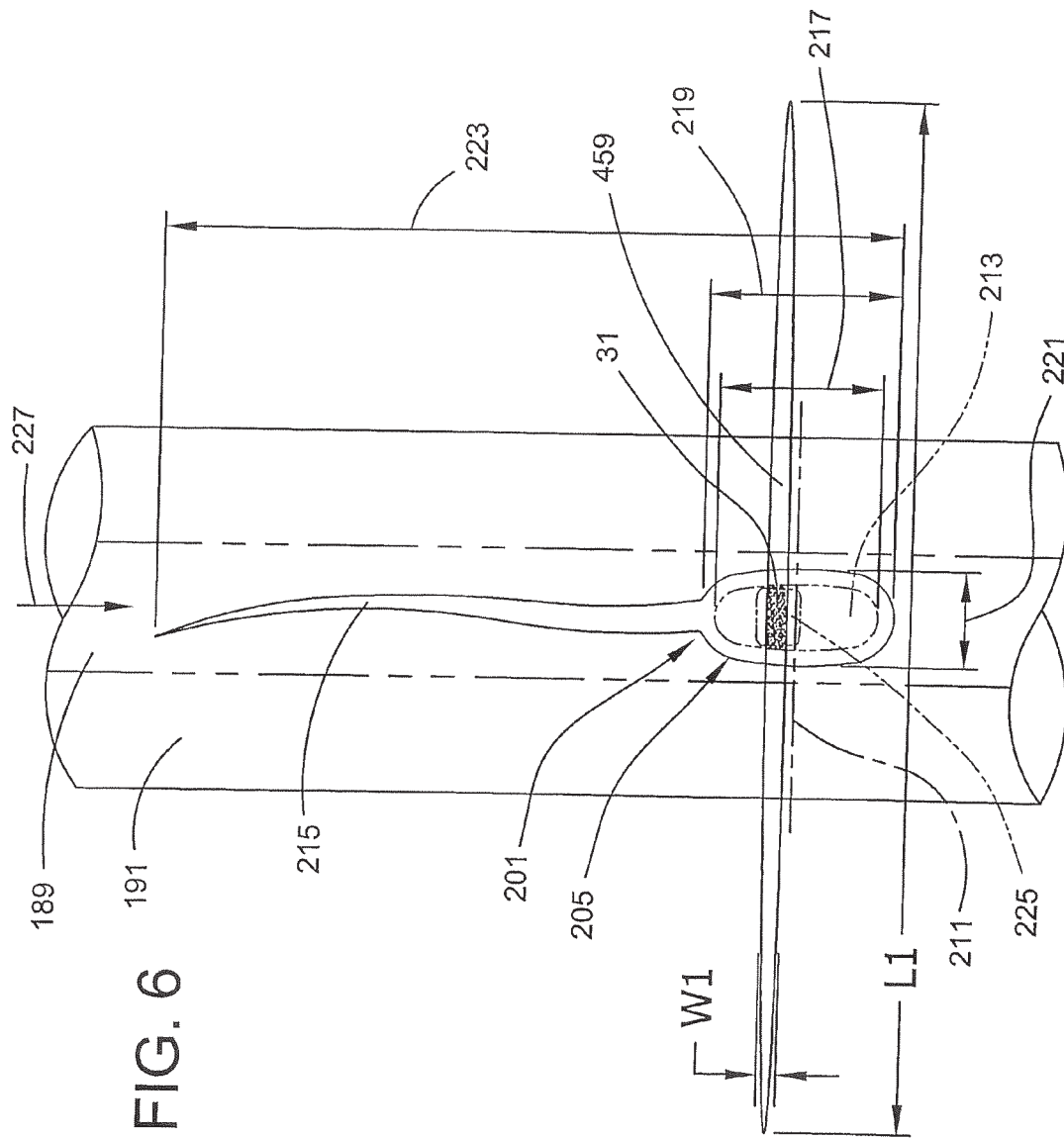


FIG. 4

FIG. 5





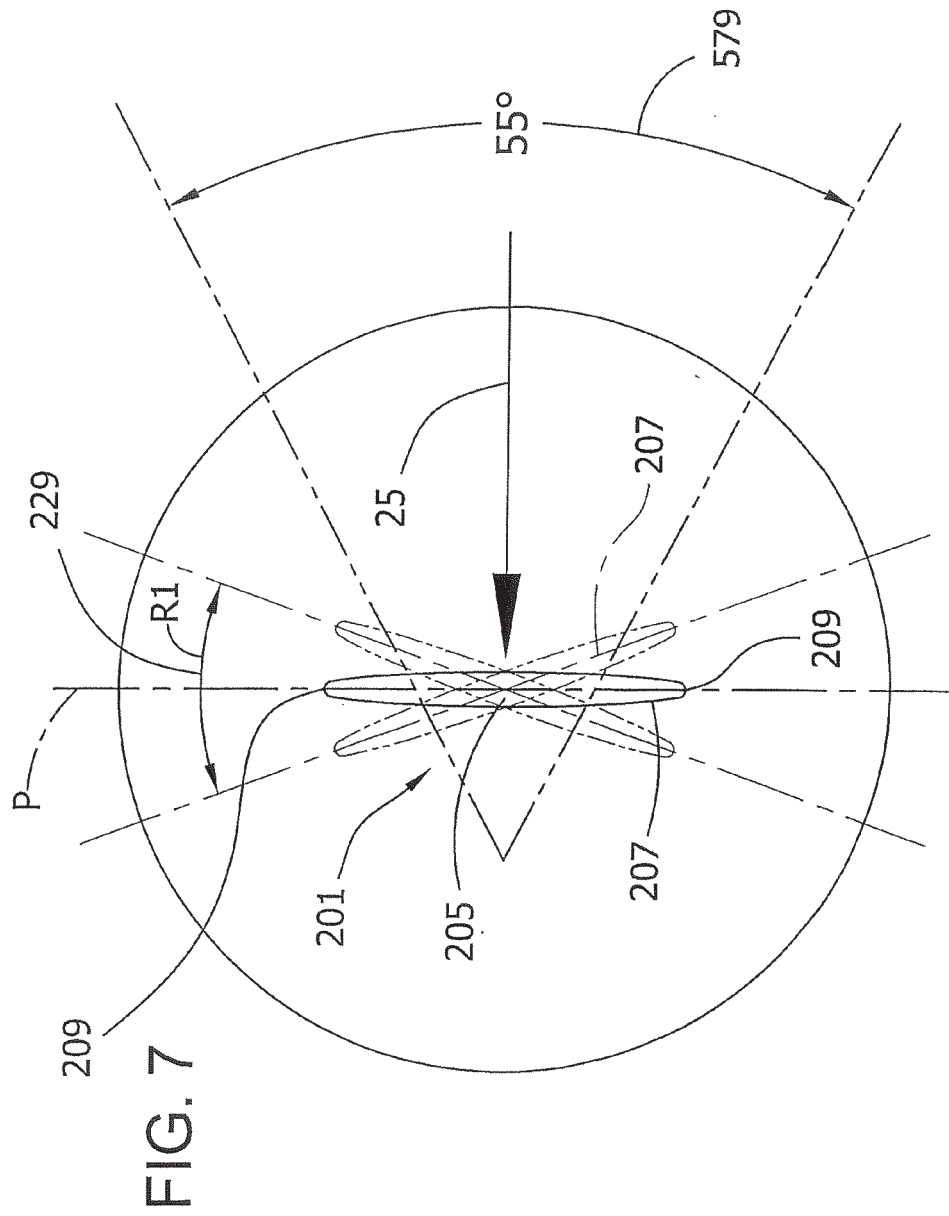




FIG. 9B

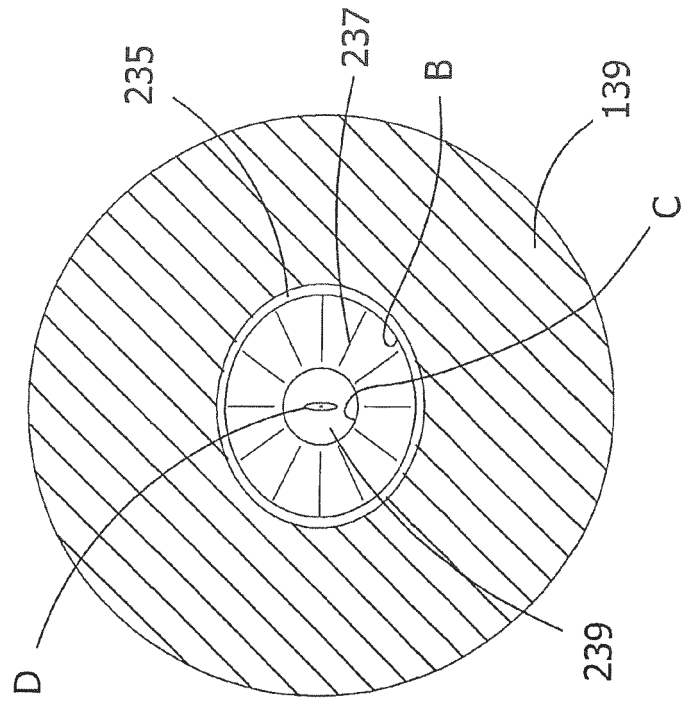


FIG. 9A

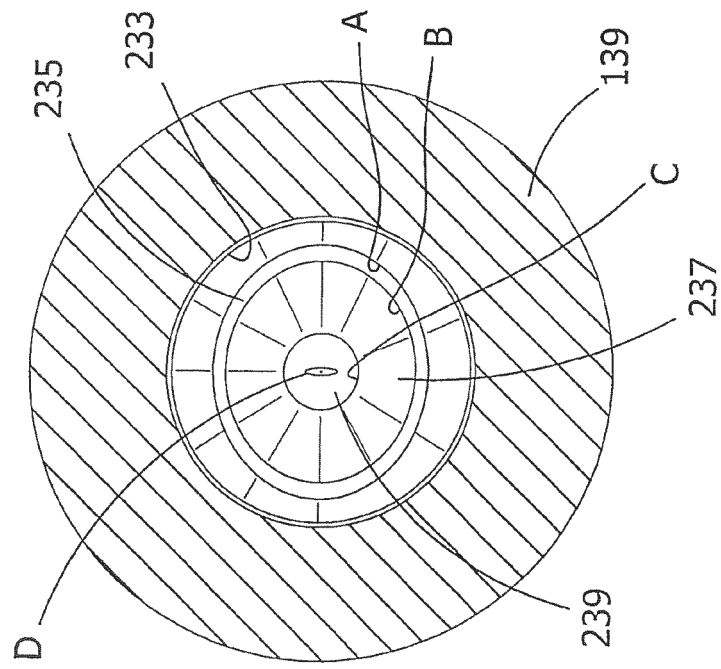


FIG. 9D

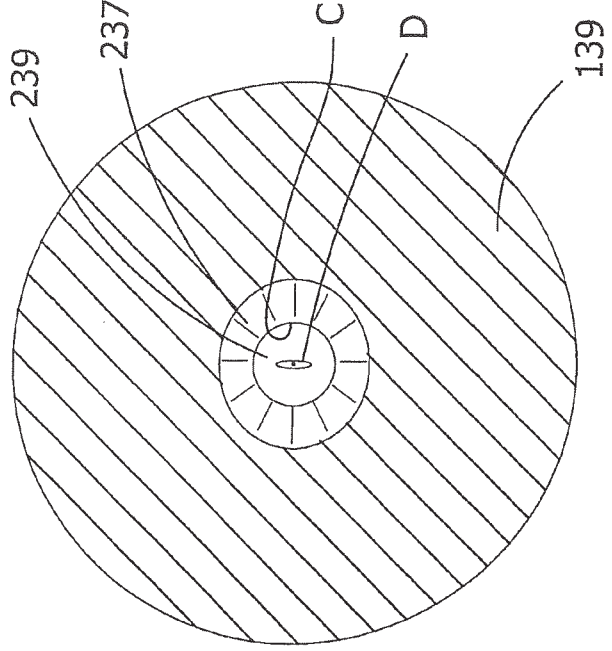


FIG. 9C

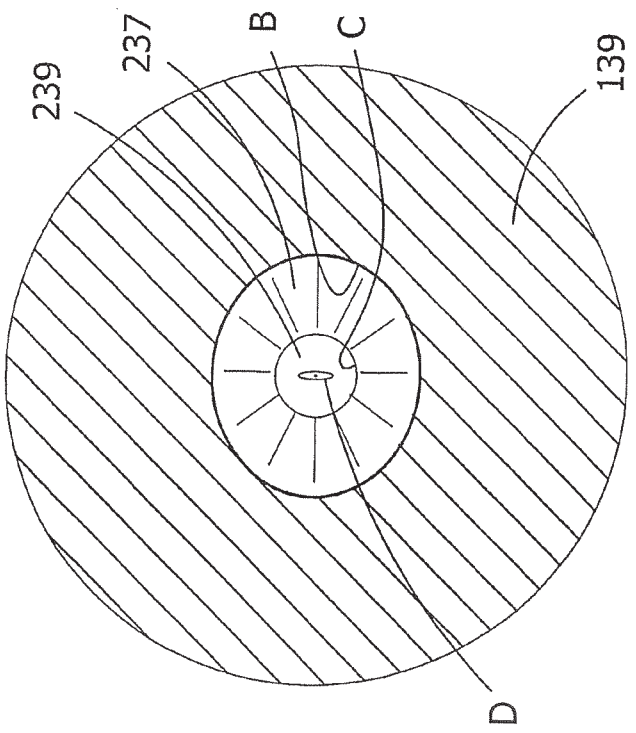


FIG. 9F

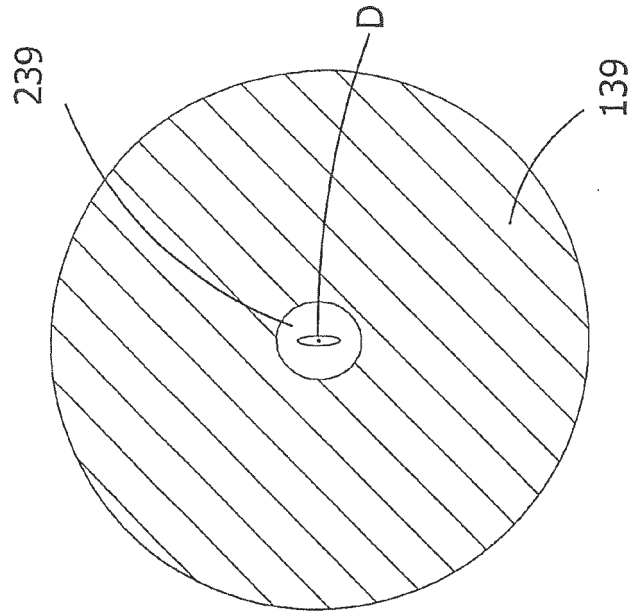


FIG. 9E

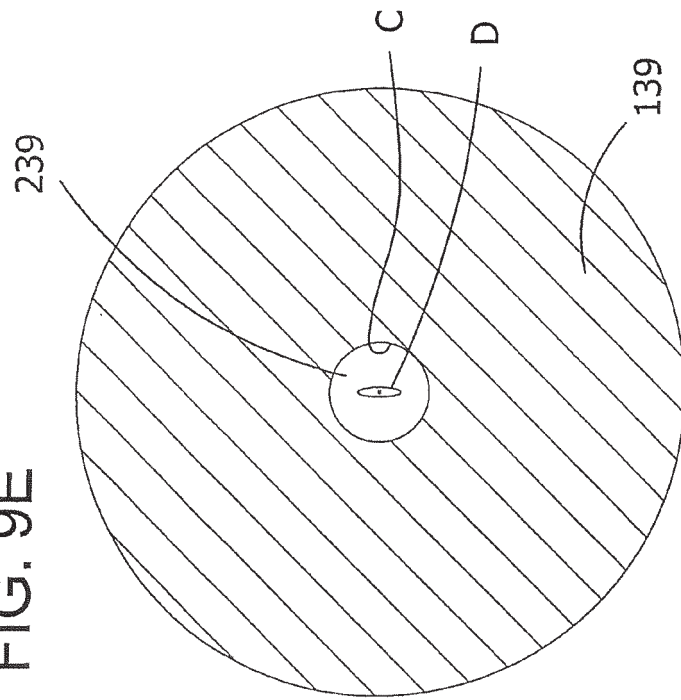


FIG. 9G

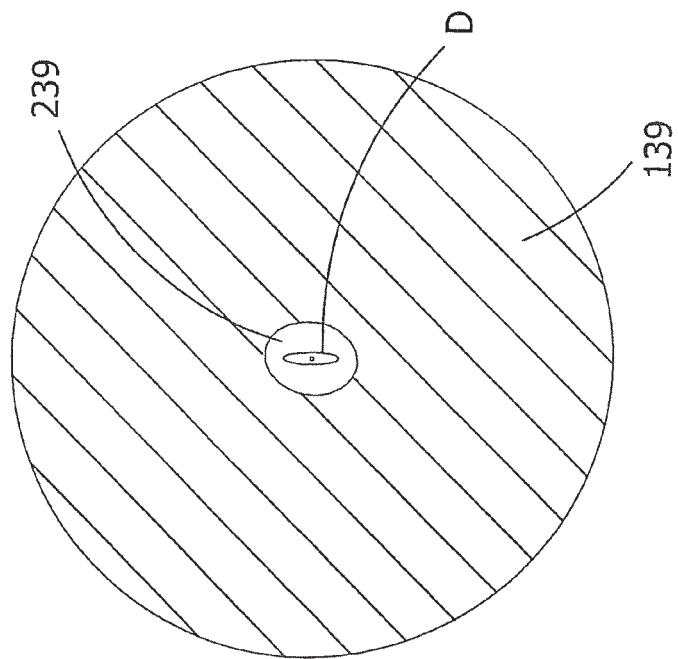


FIG. 9H

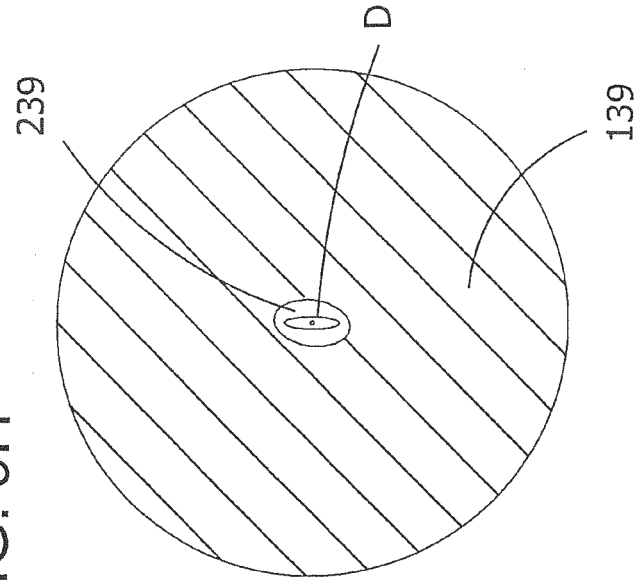


FIG. 9J

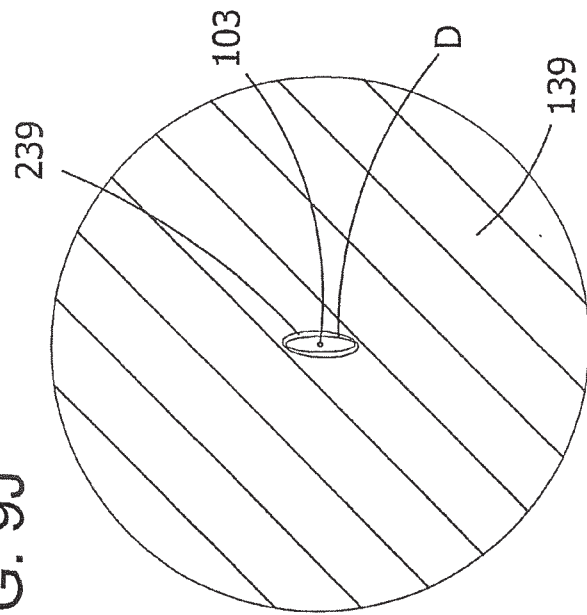


FIG. 9K

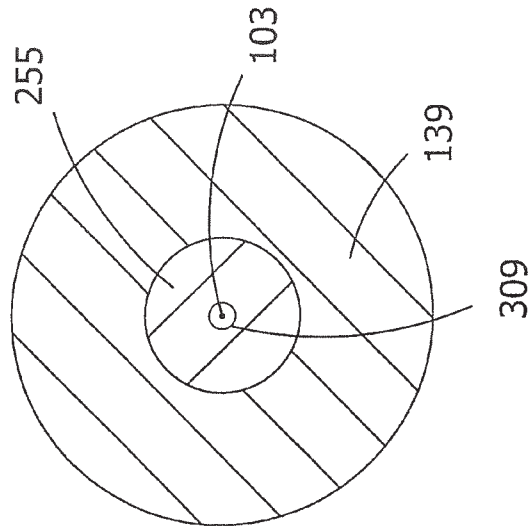


FIG. 10

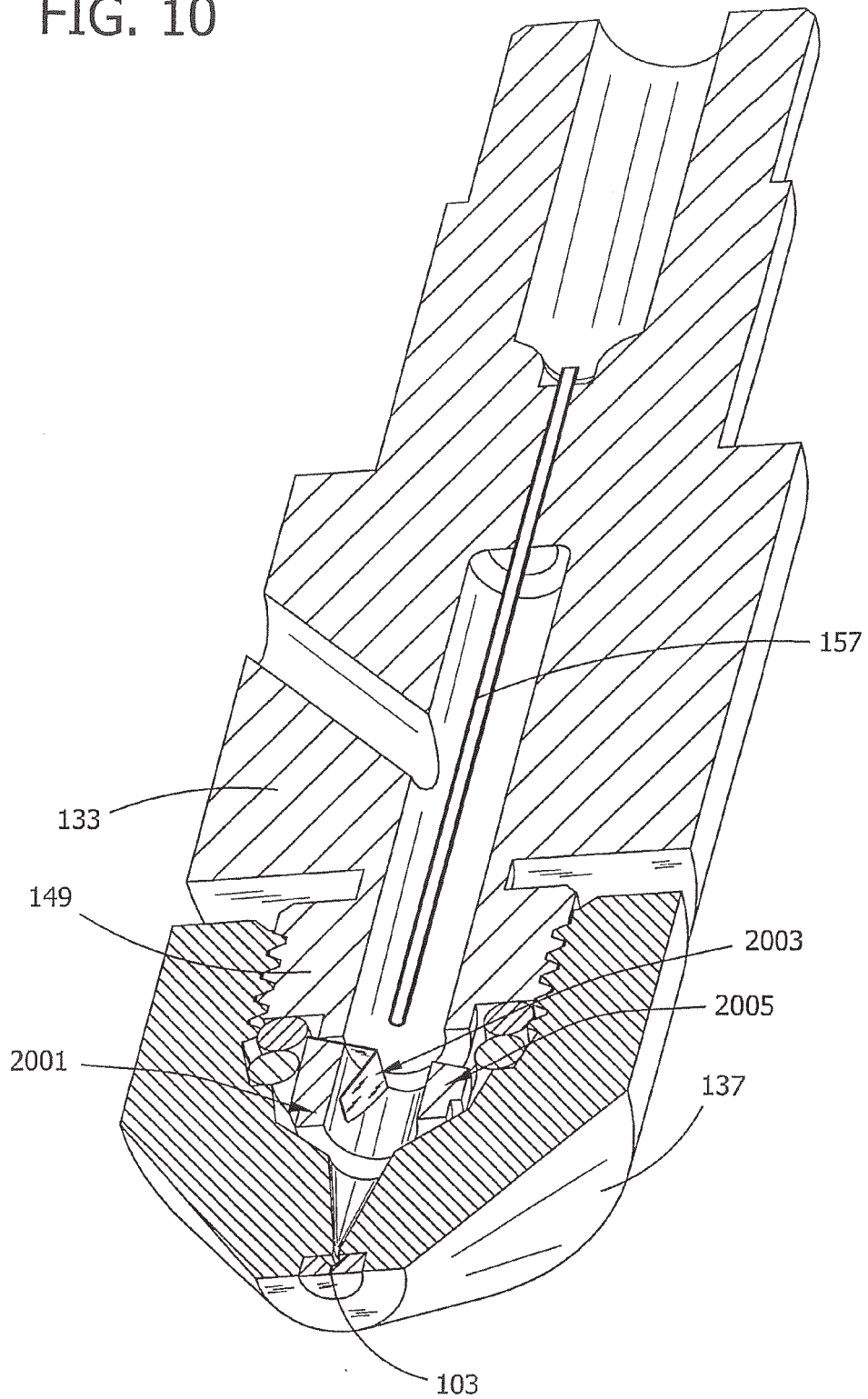


FIG. 11

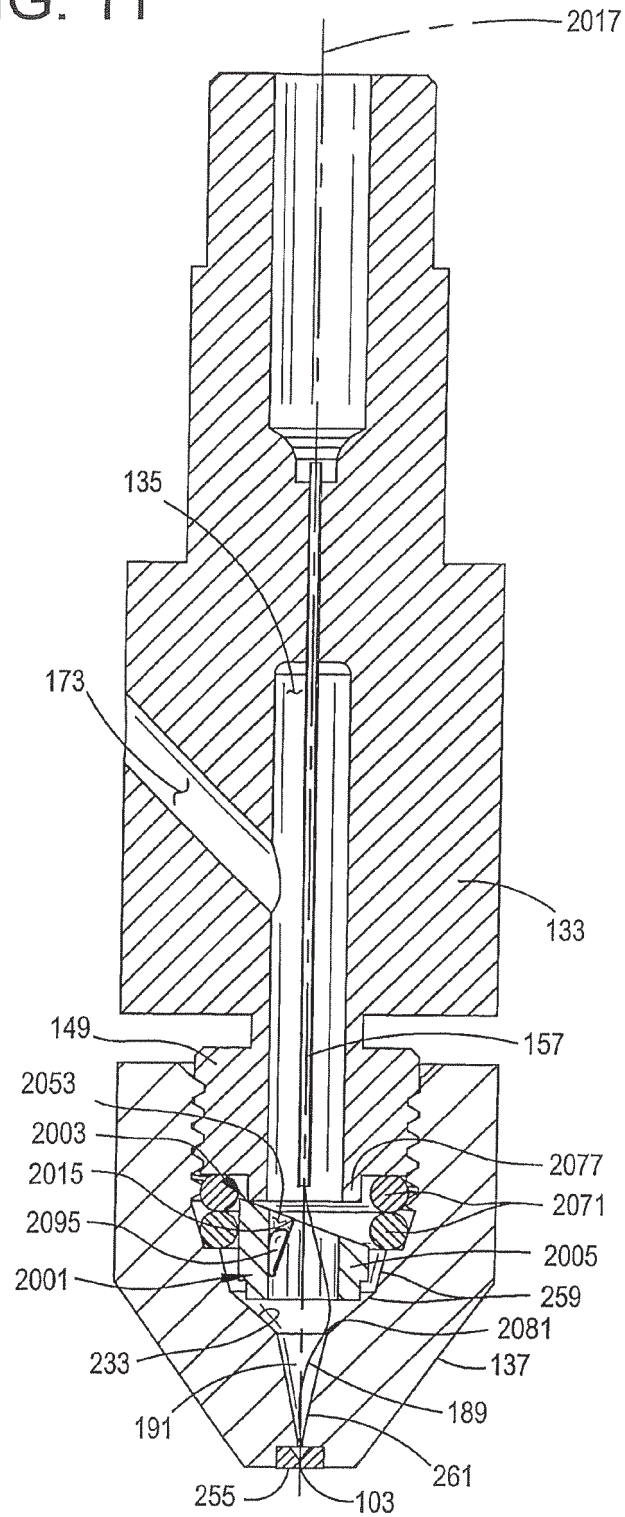


FIG. 12

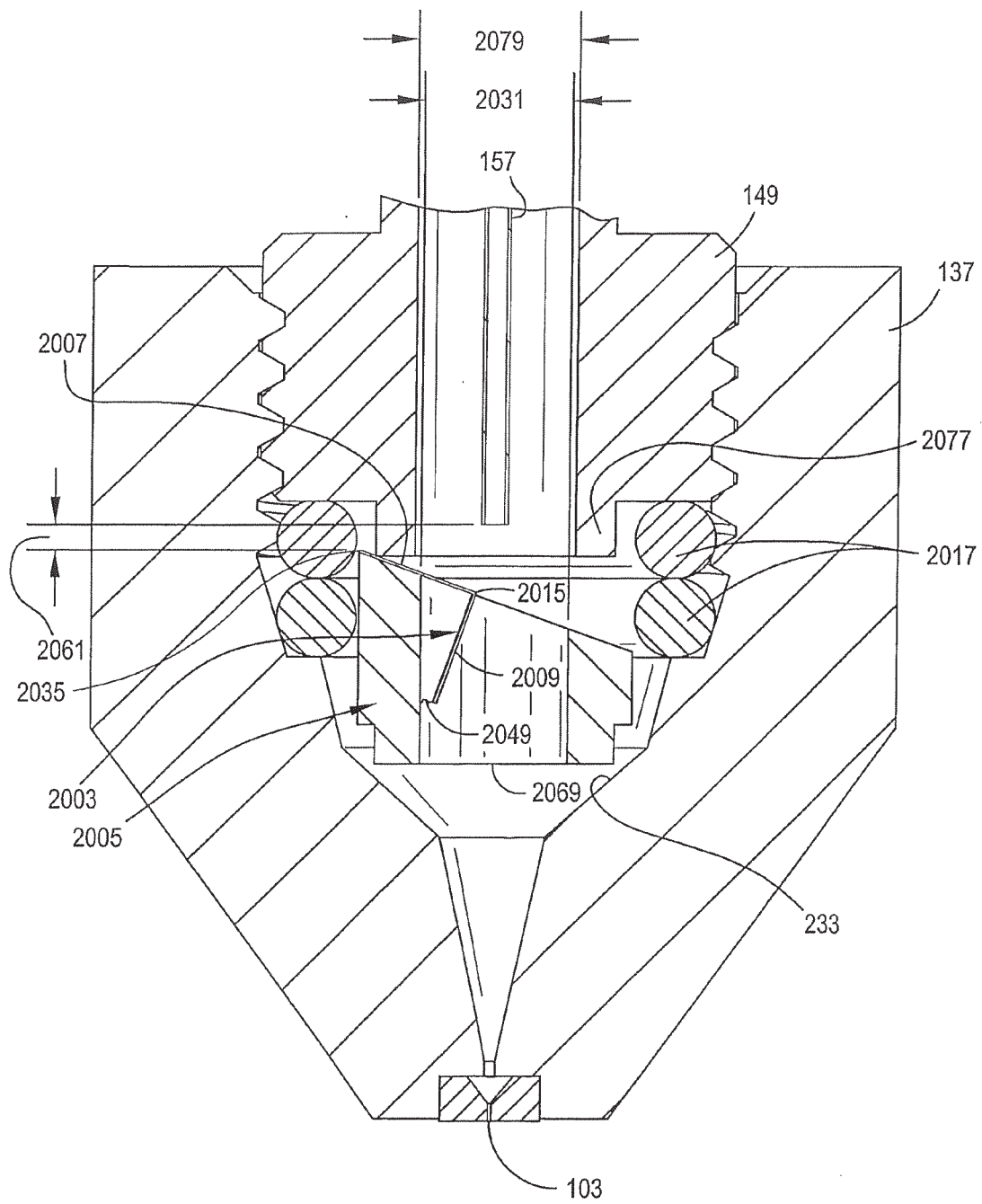


FIG. 13

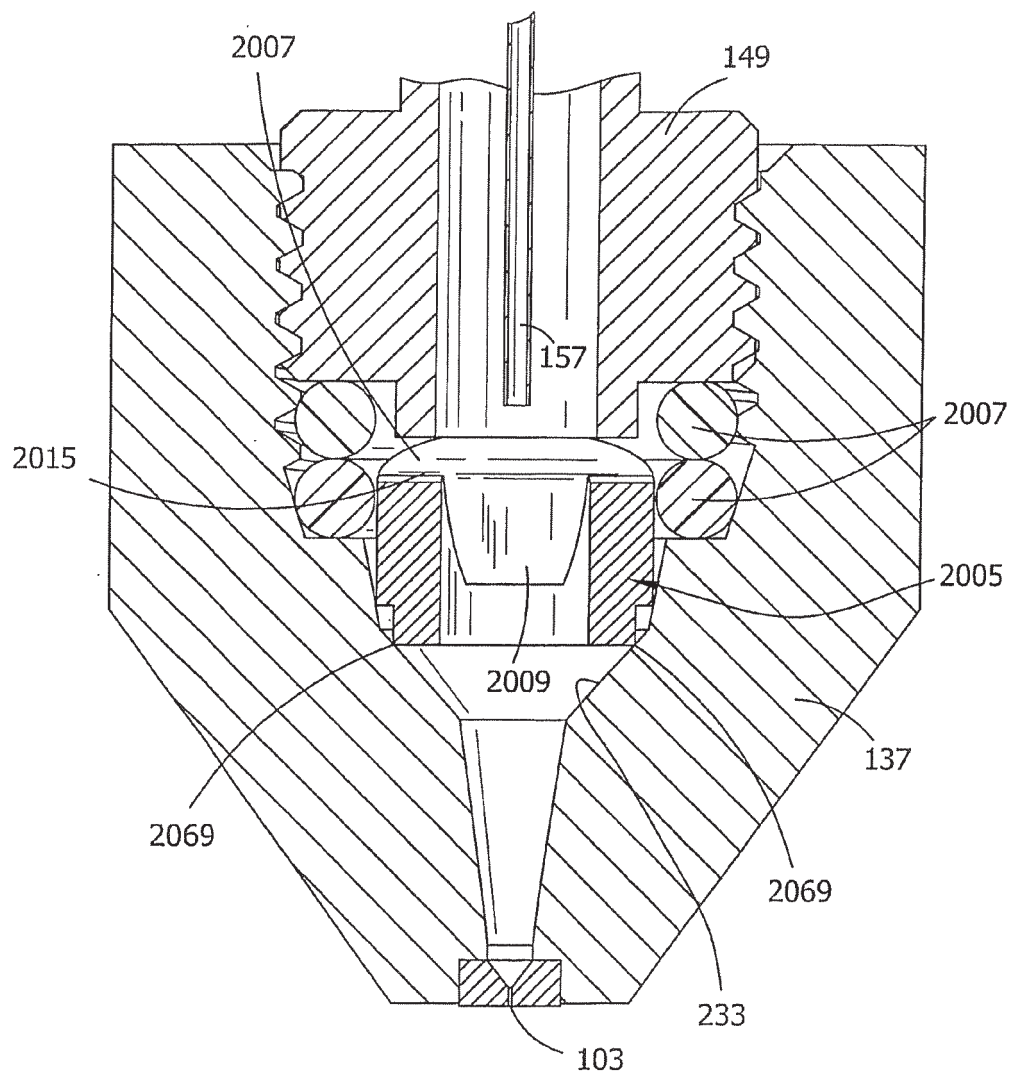


FIG. 14

FIG. 15

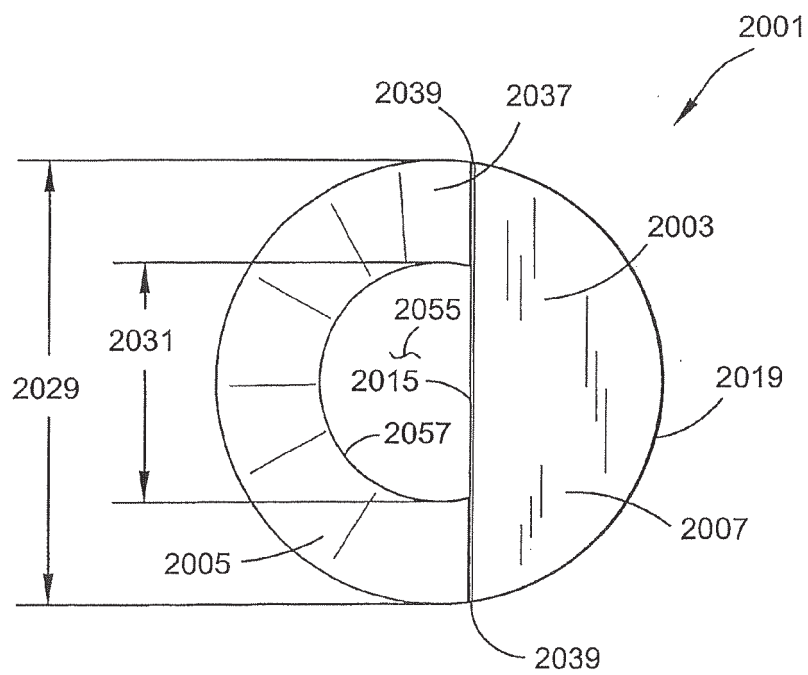


FIG. 16

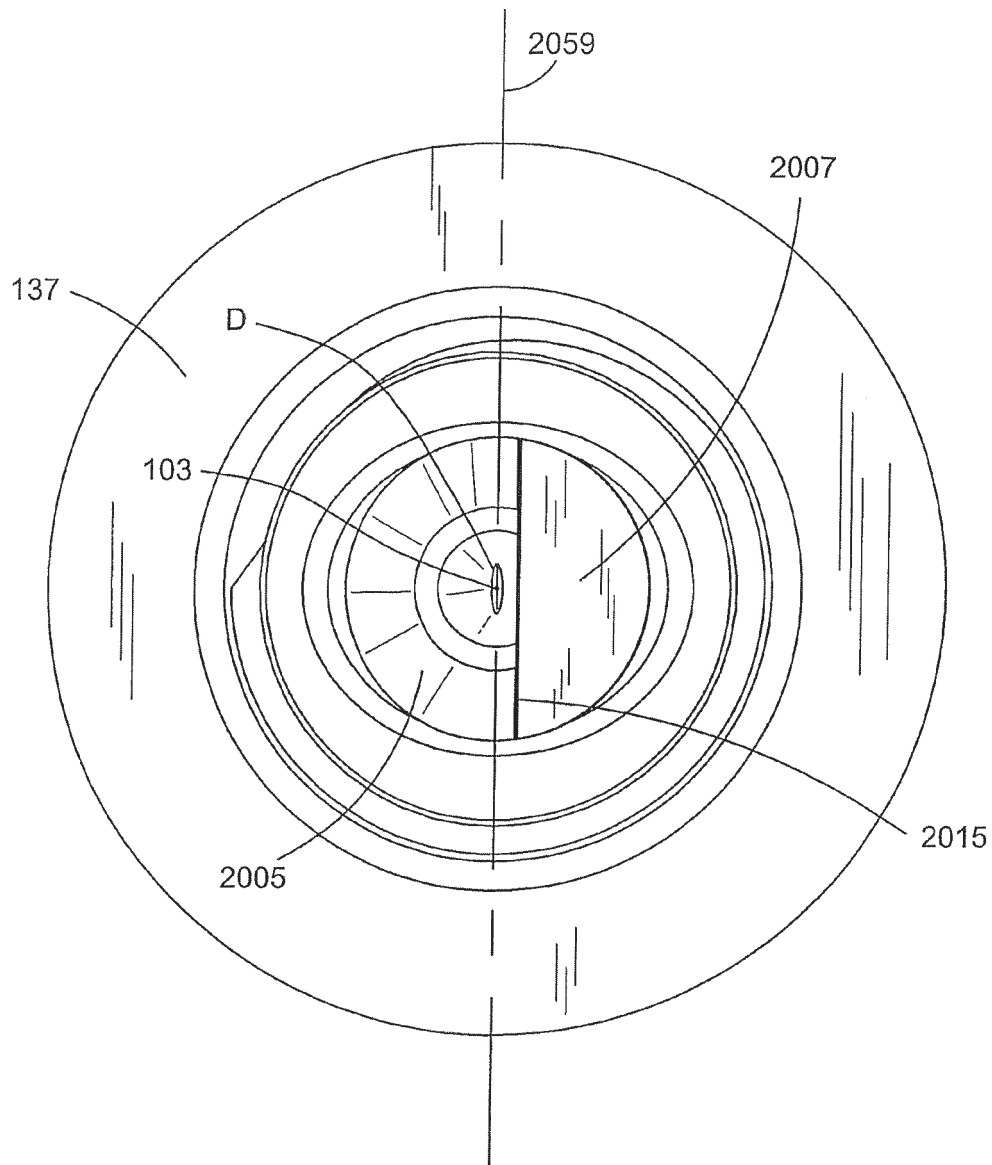
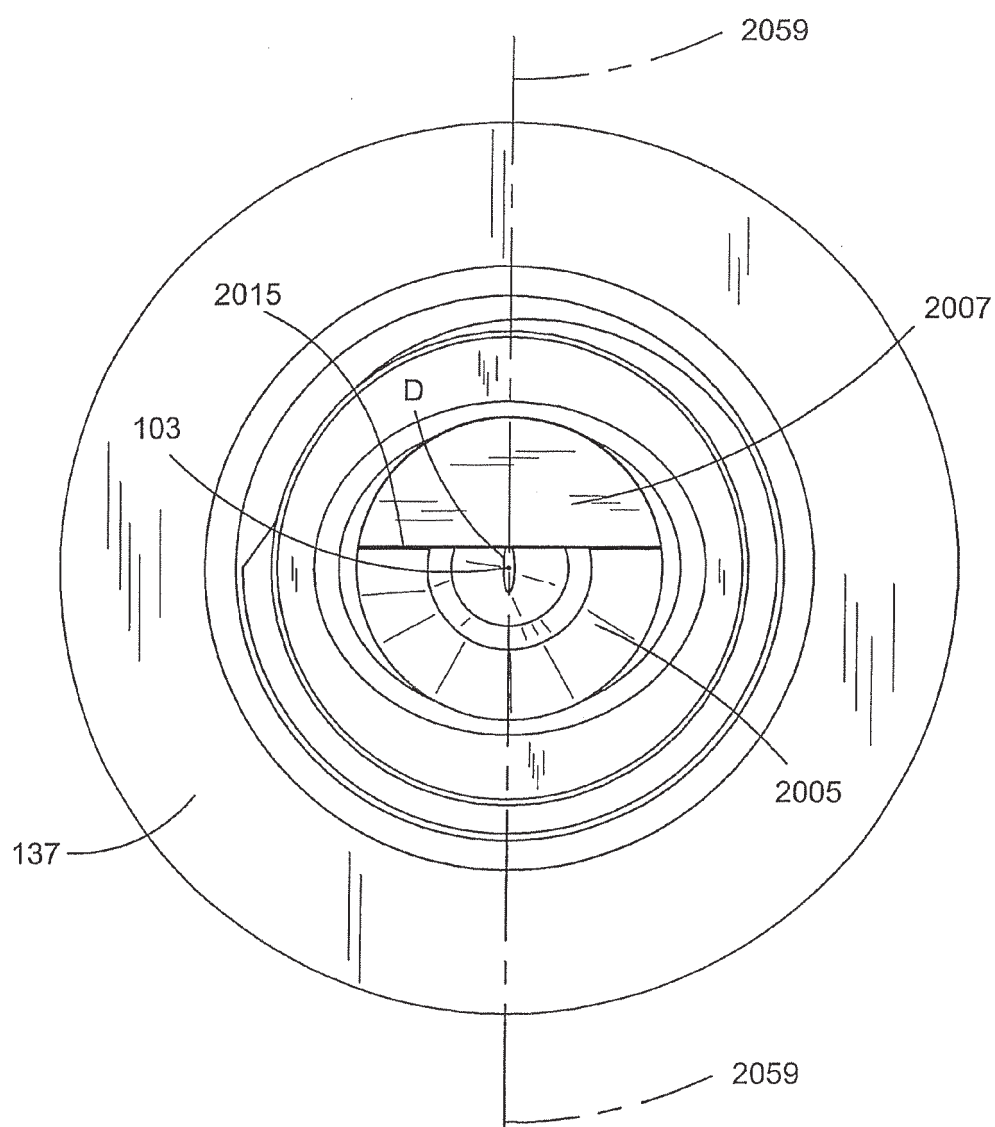
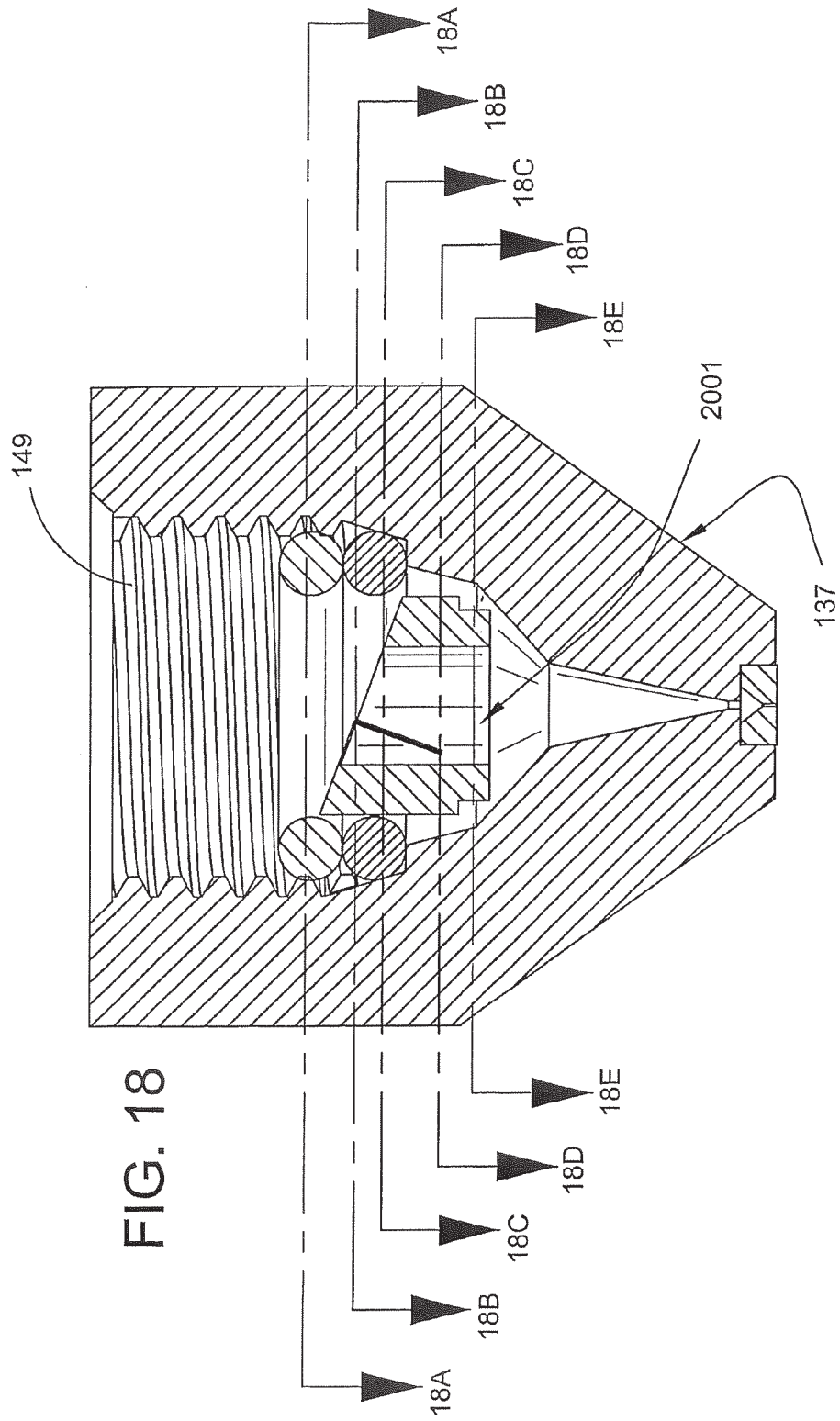


FIG. 17





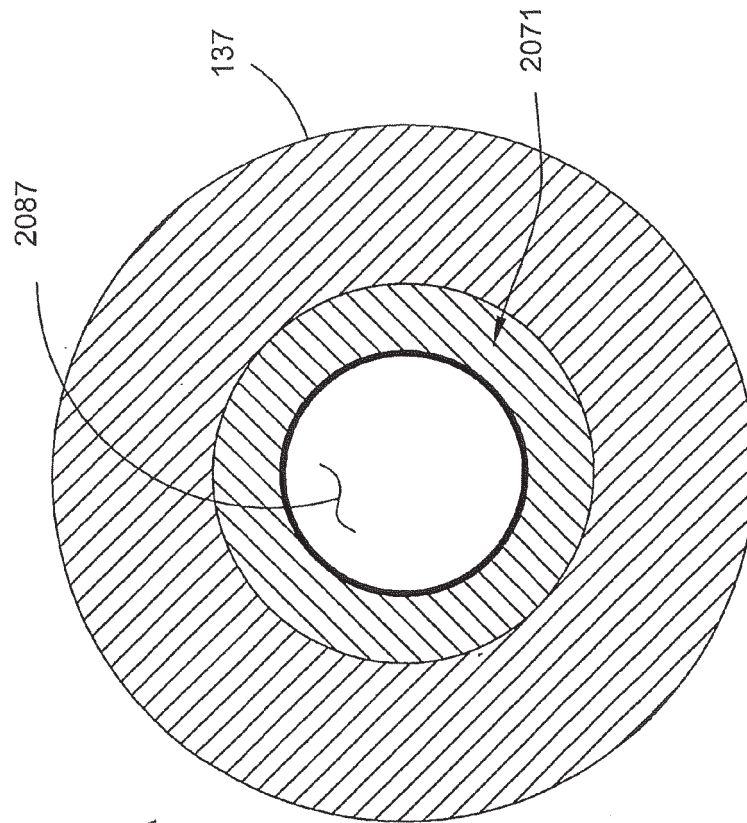
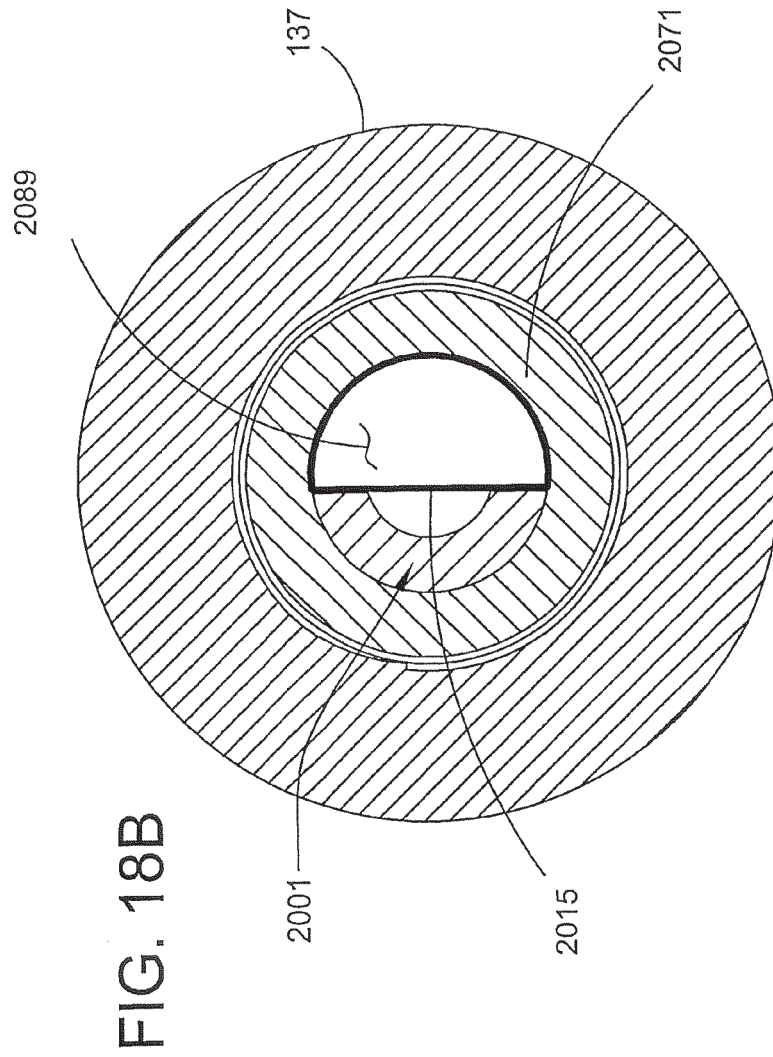
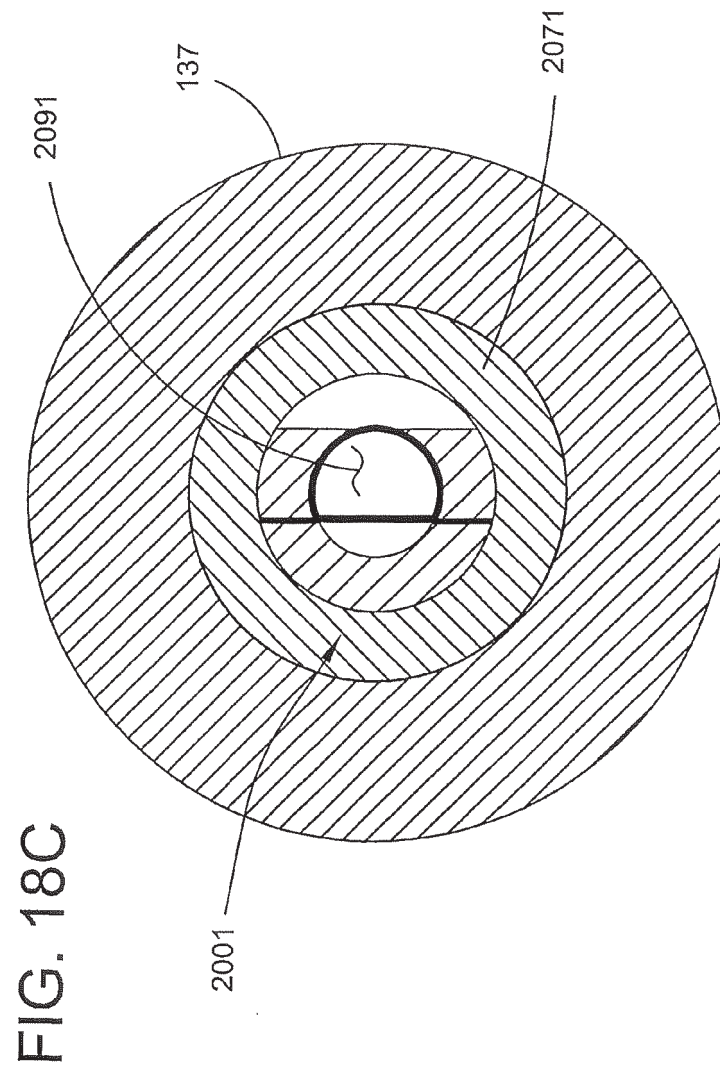
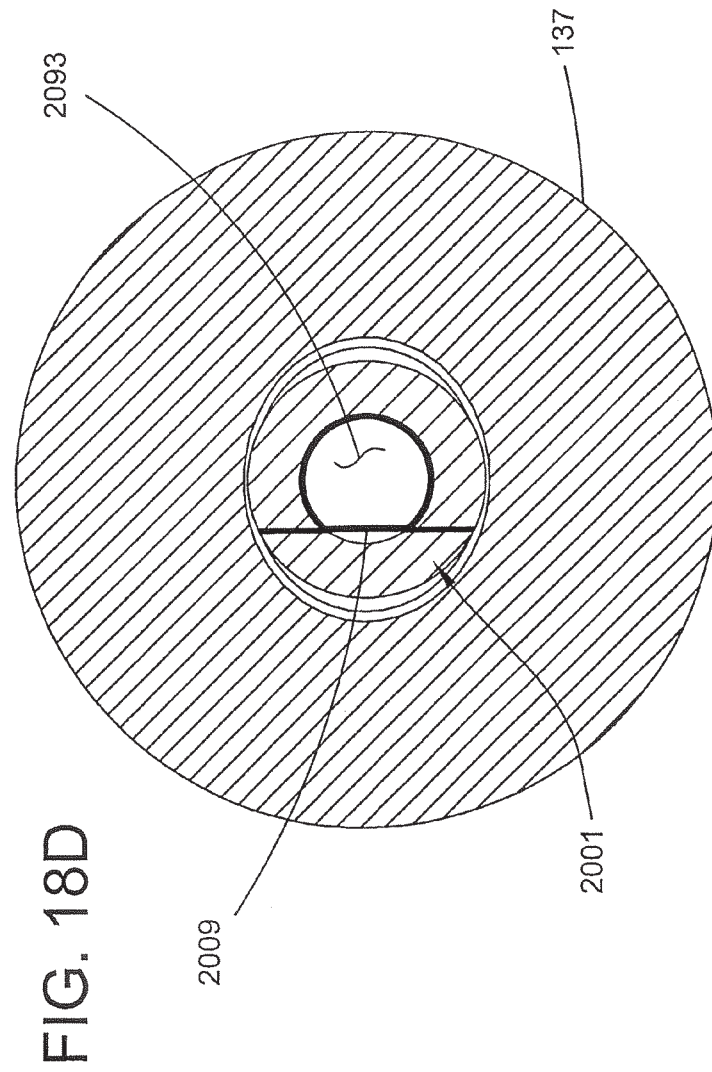


FIG. 18A







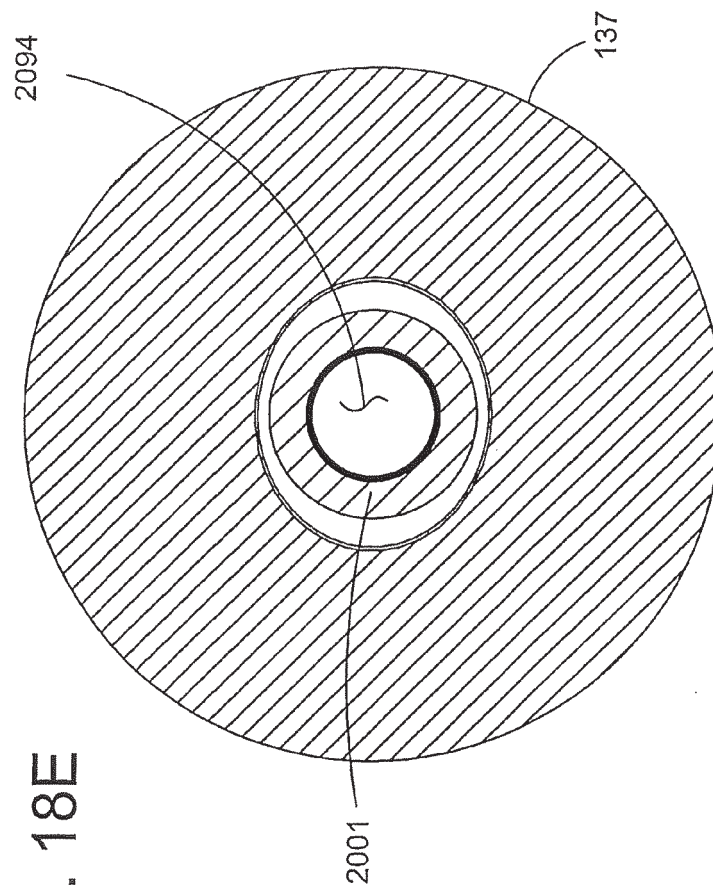


FIG. 18E

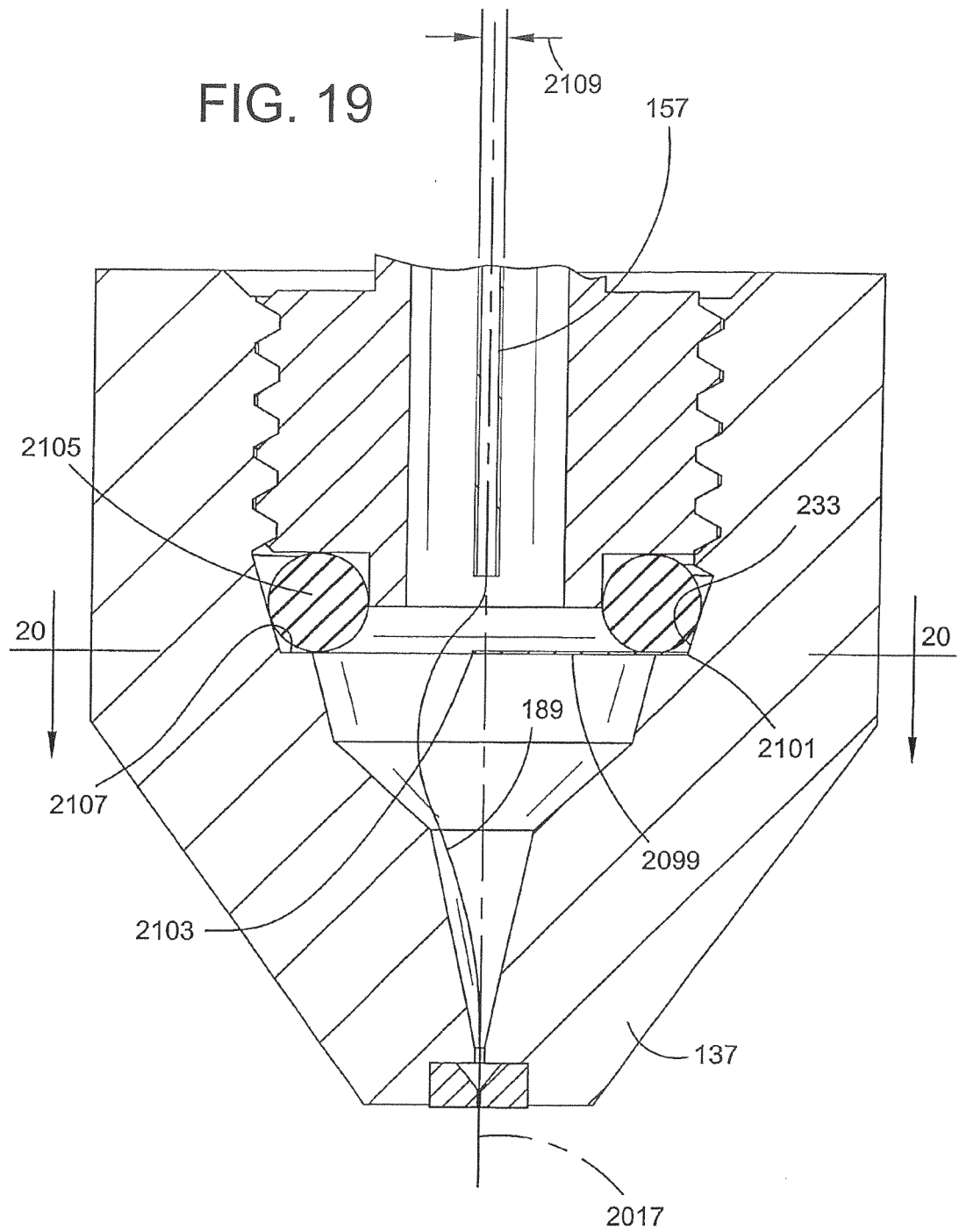


FIG. 20

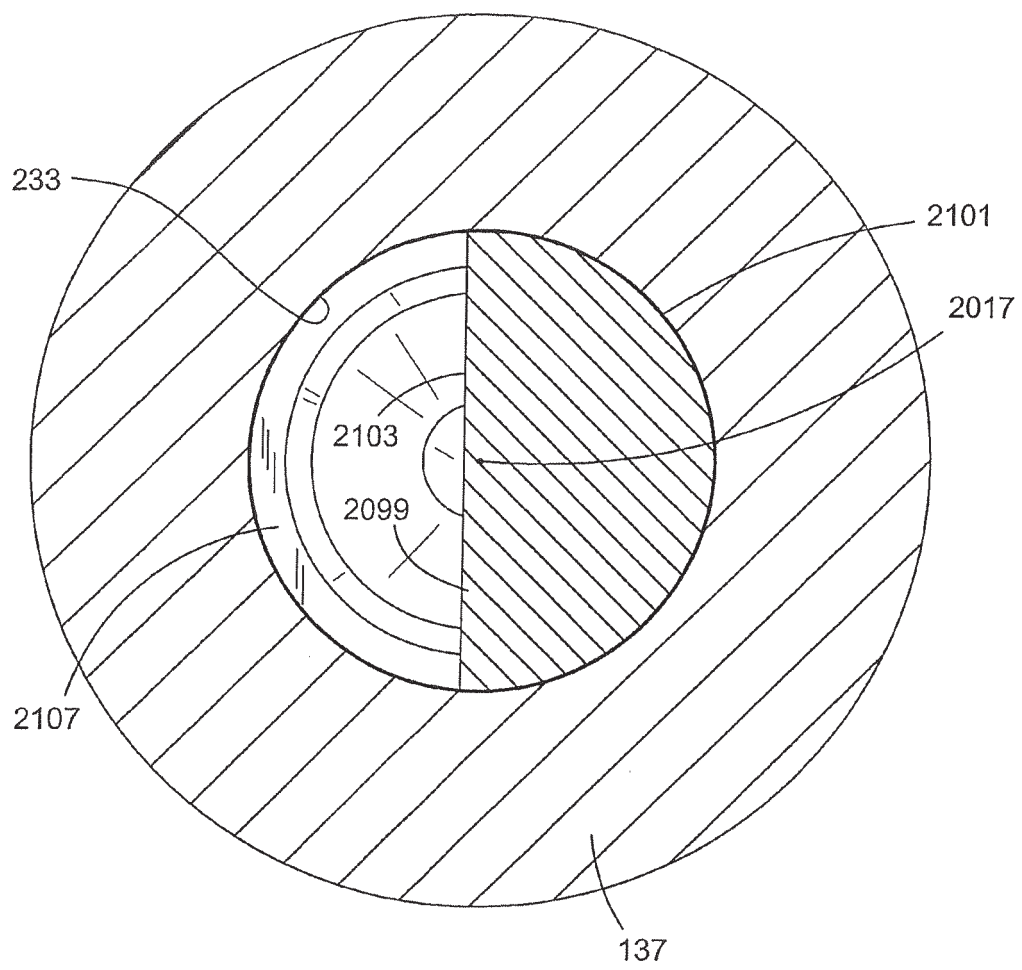


FIG. 21

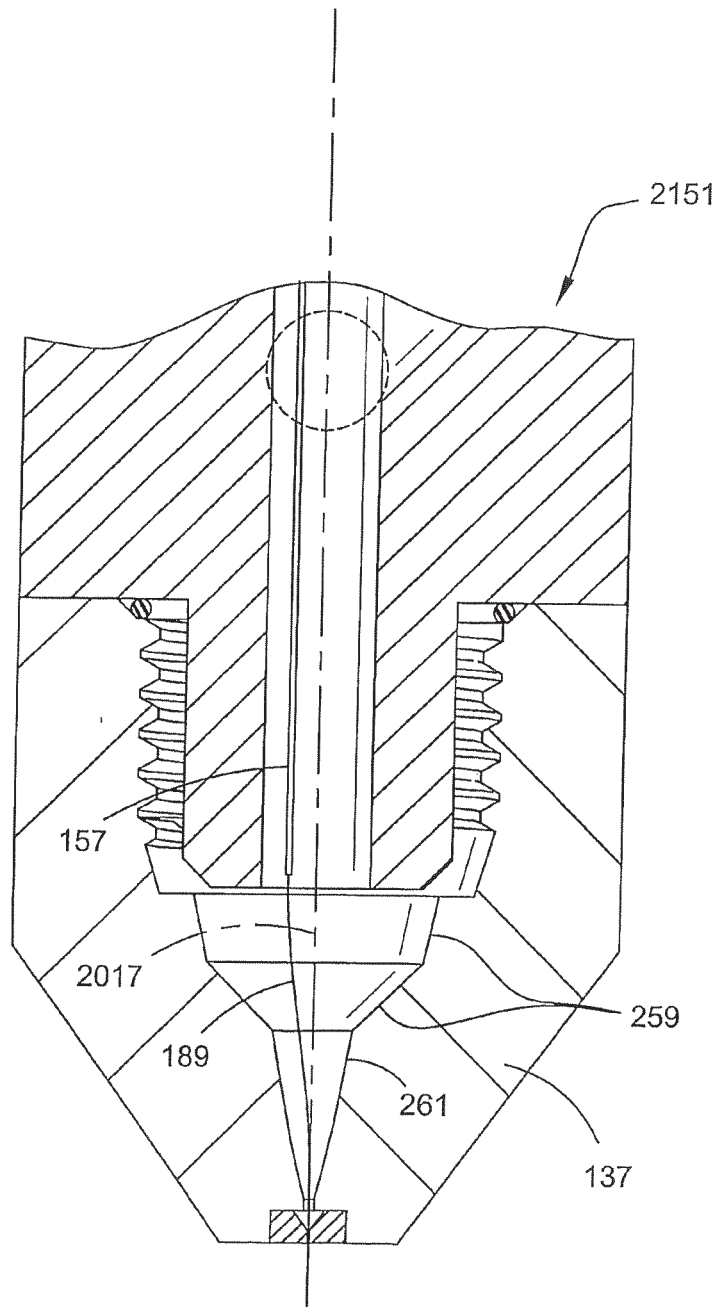
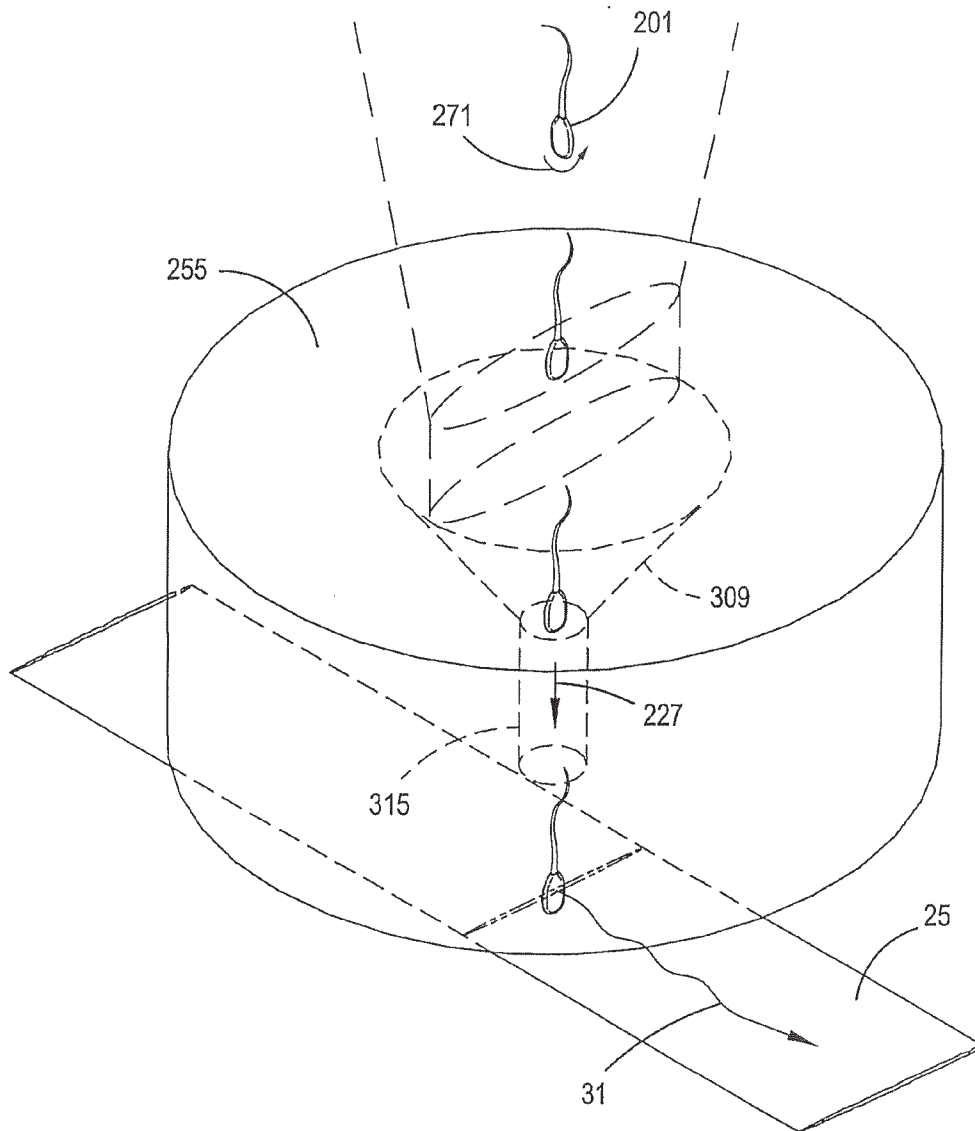
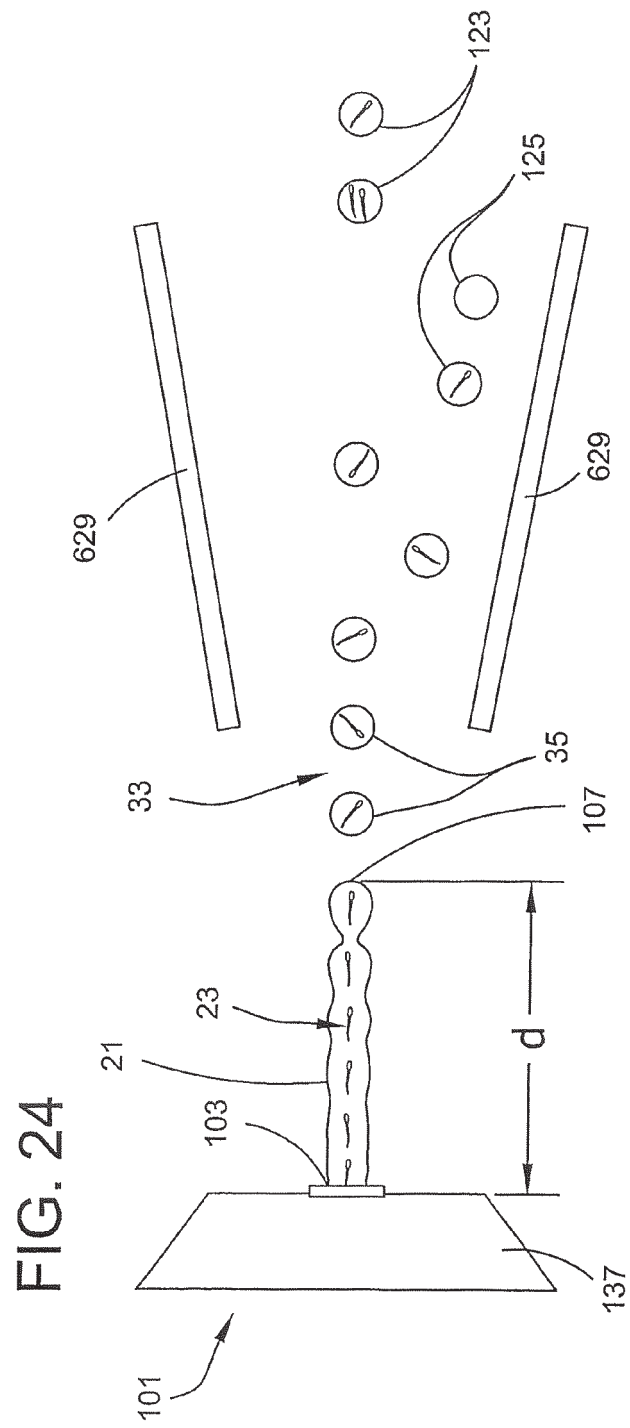




FIG. 23





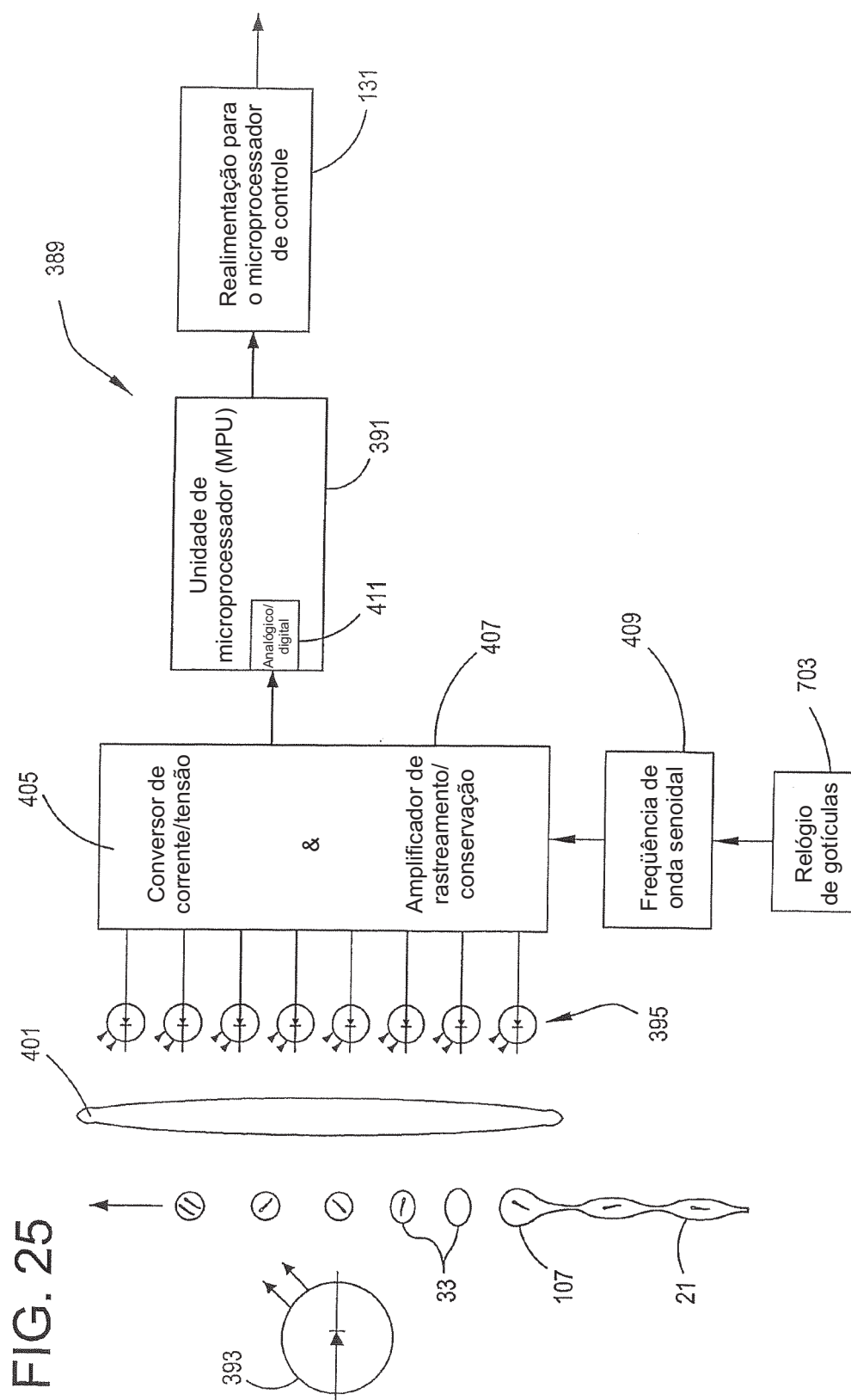
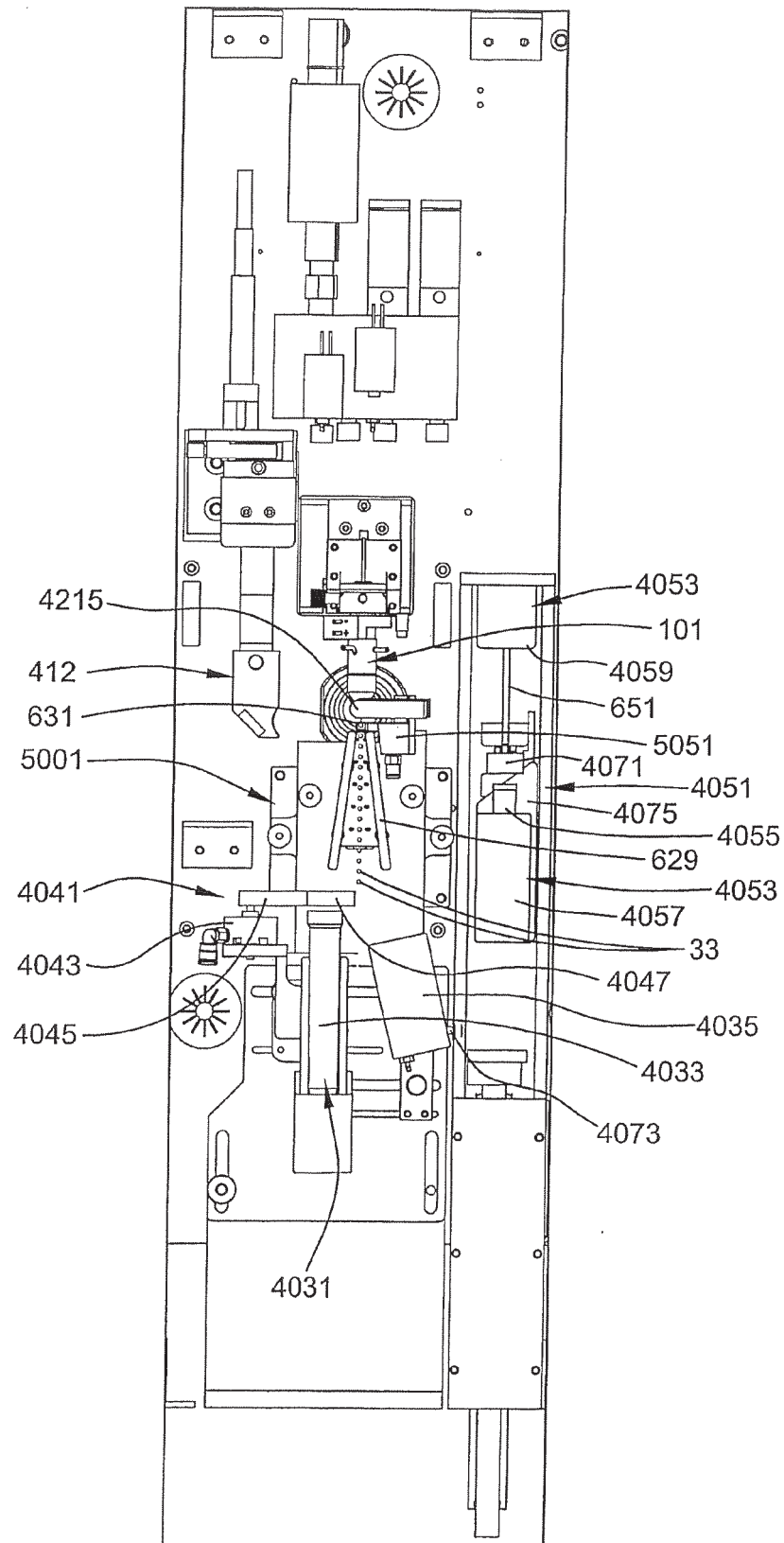


FIG. 26



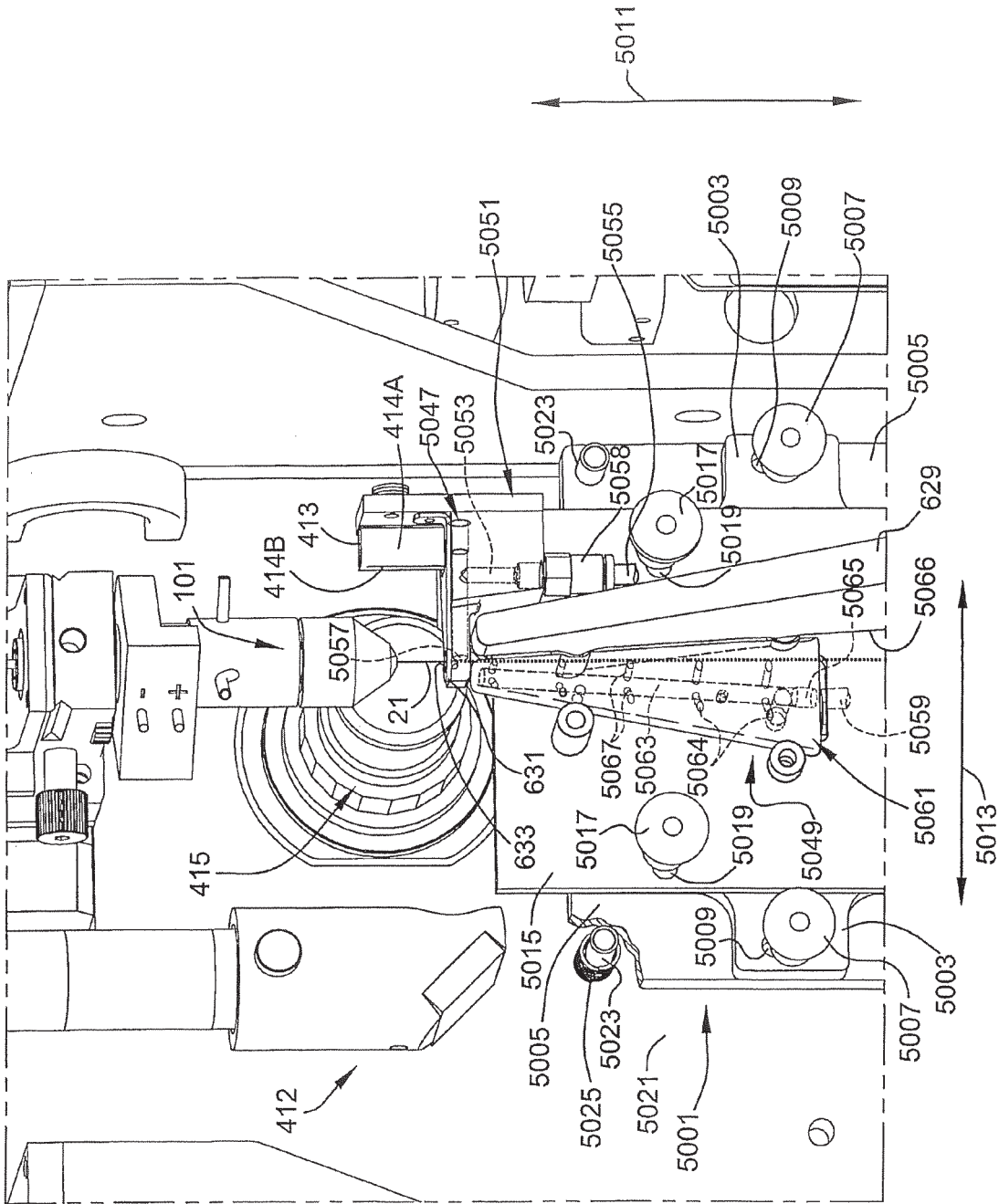


FIG. 27

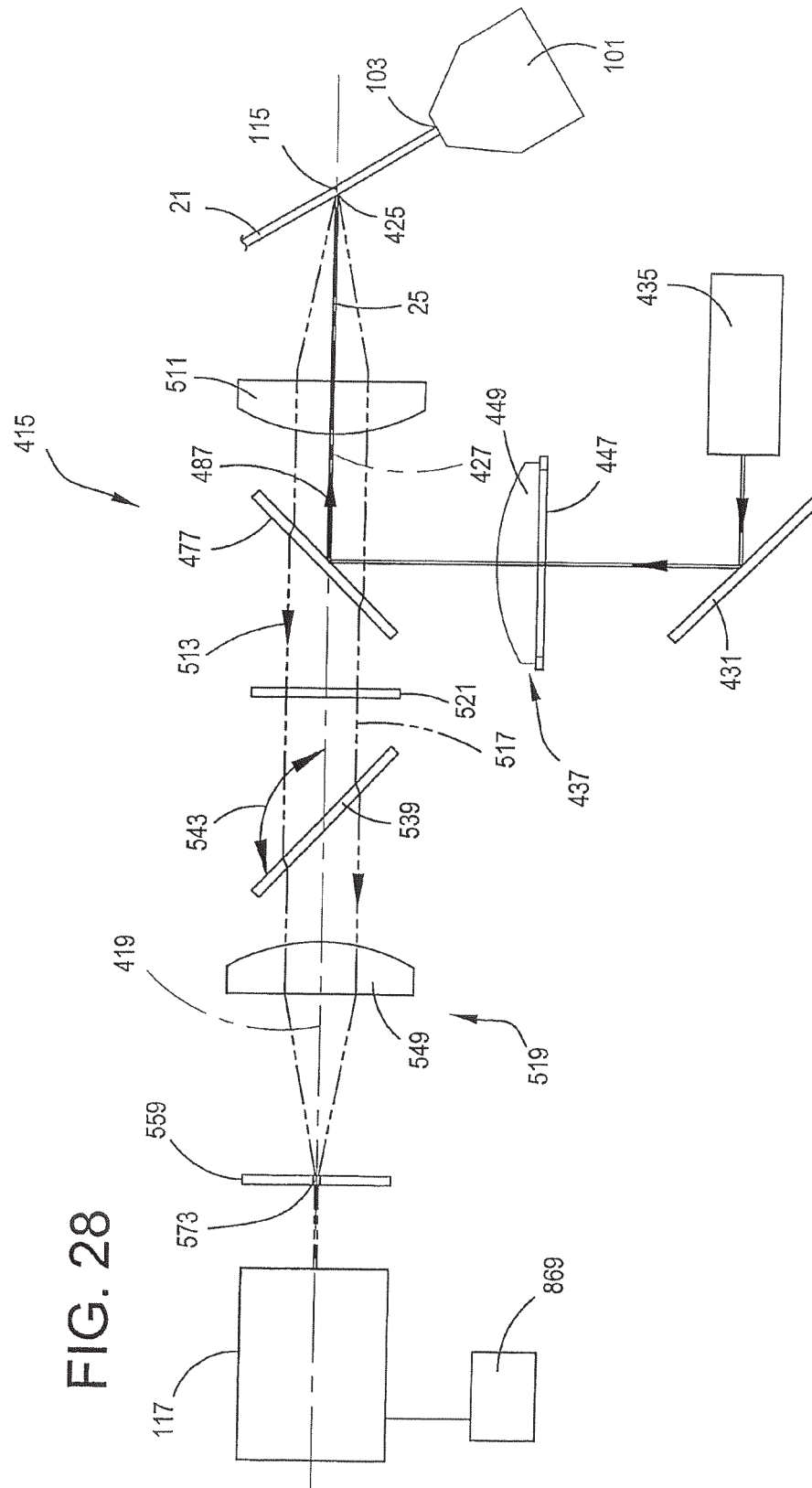
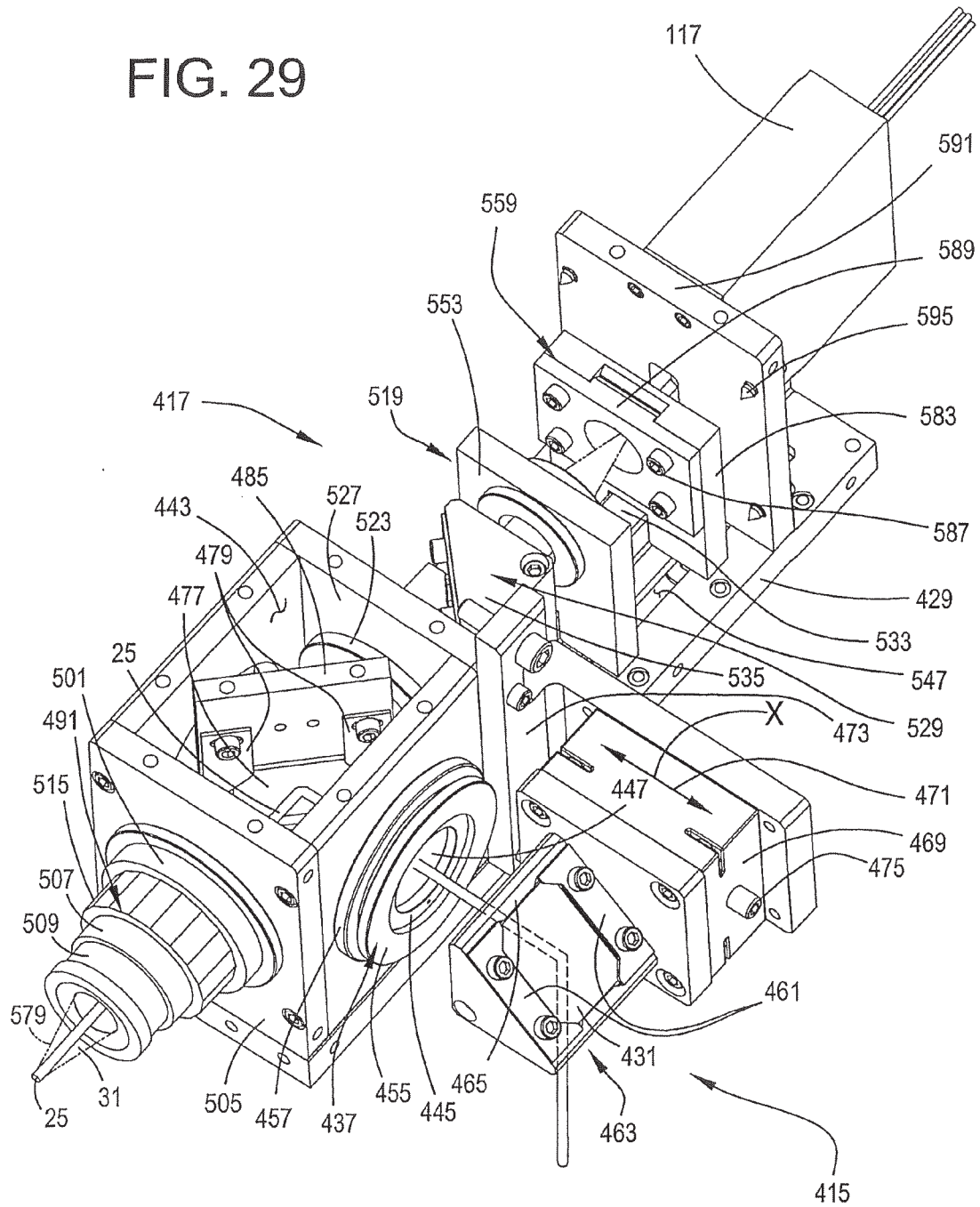


FIG. 29



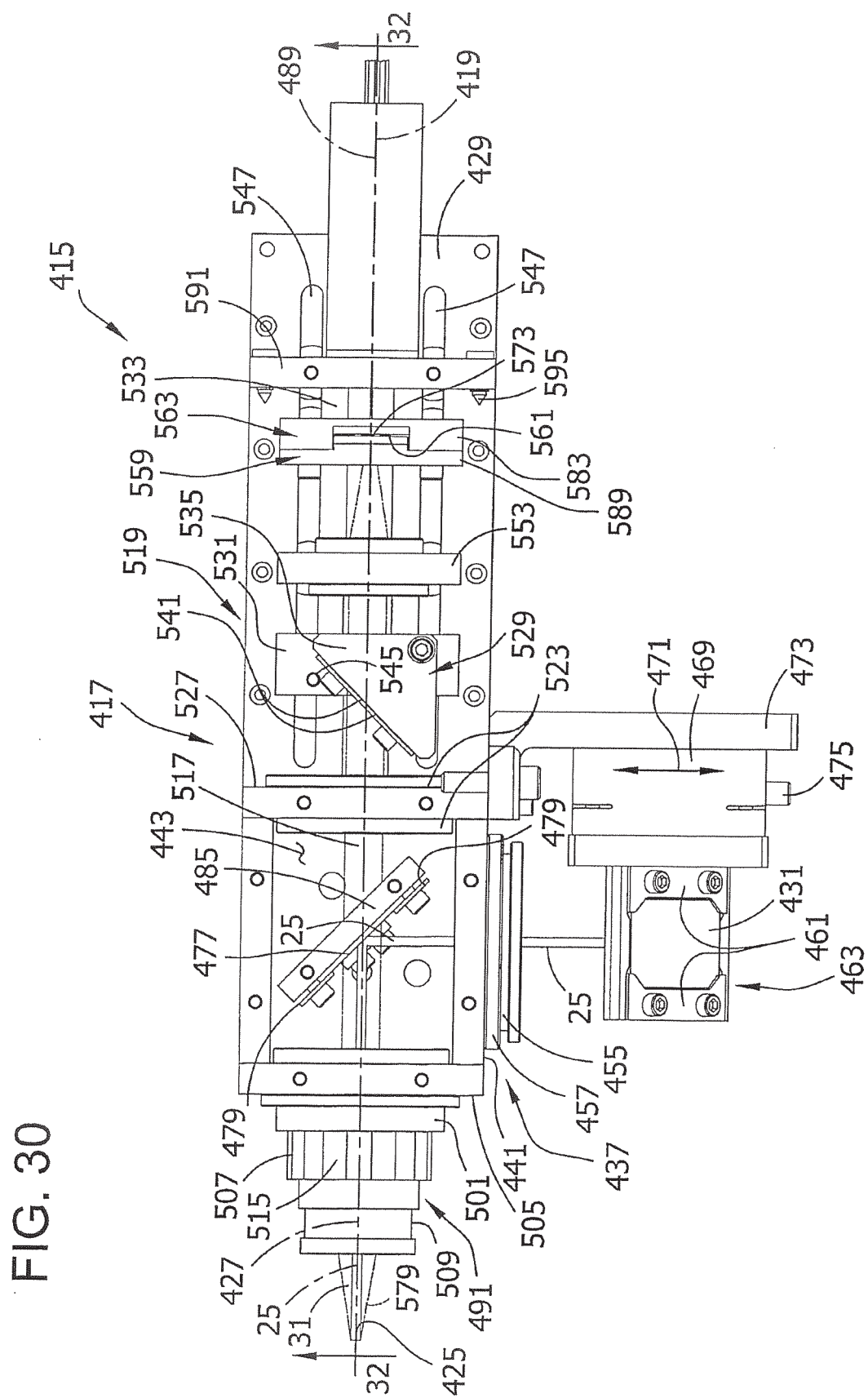
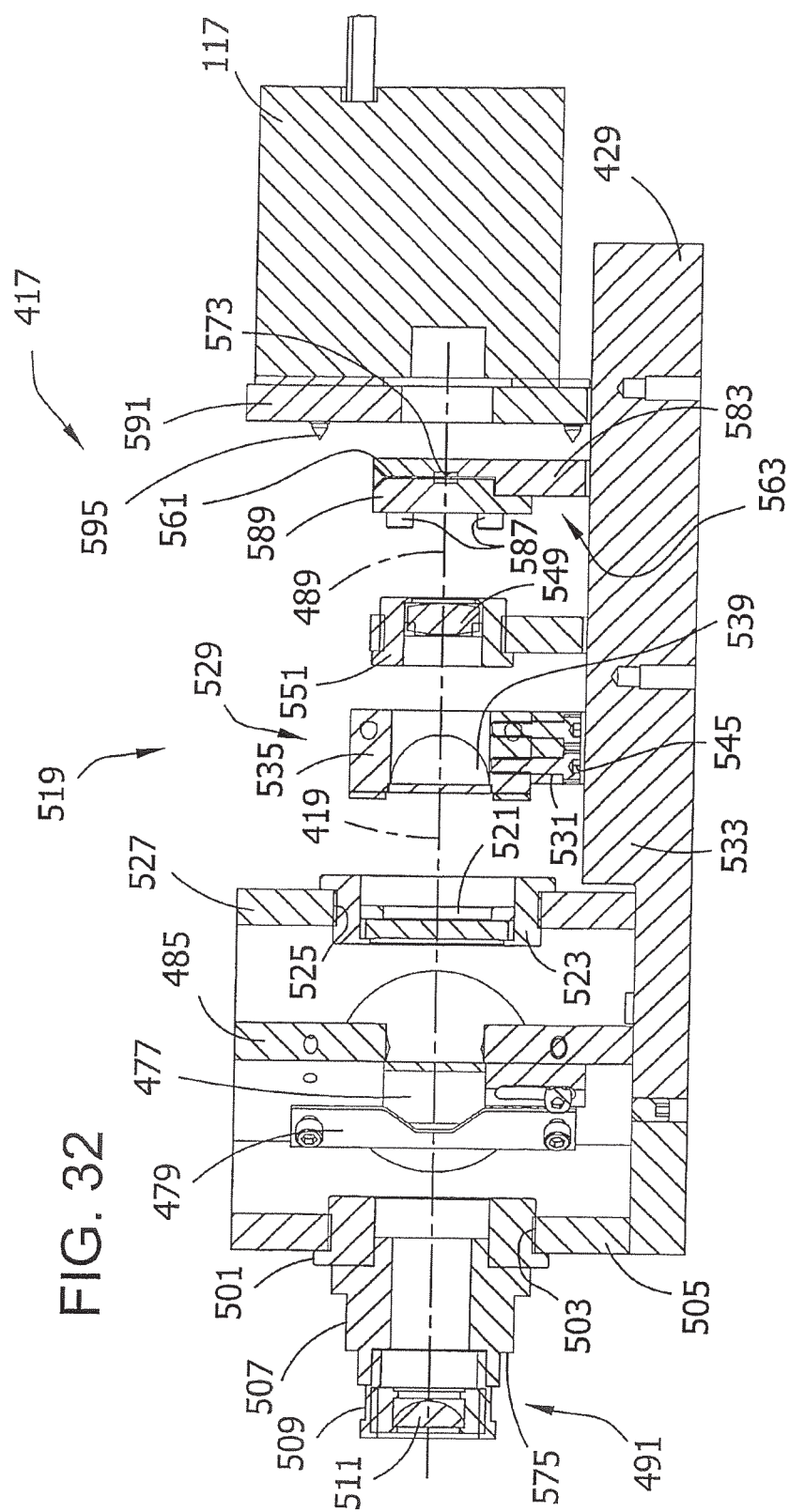
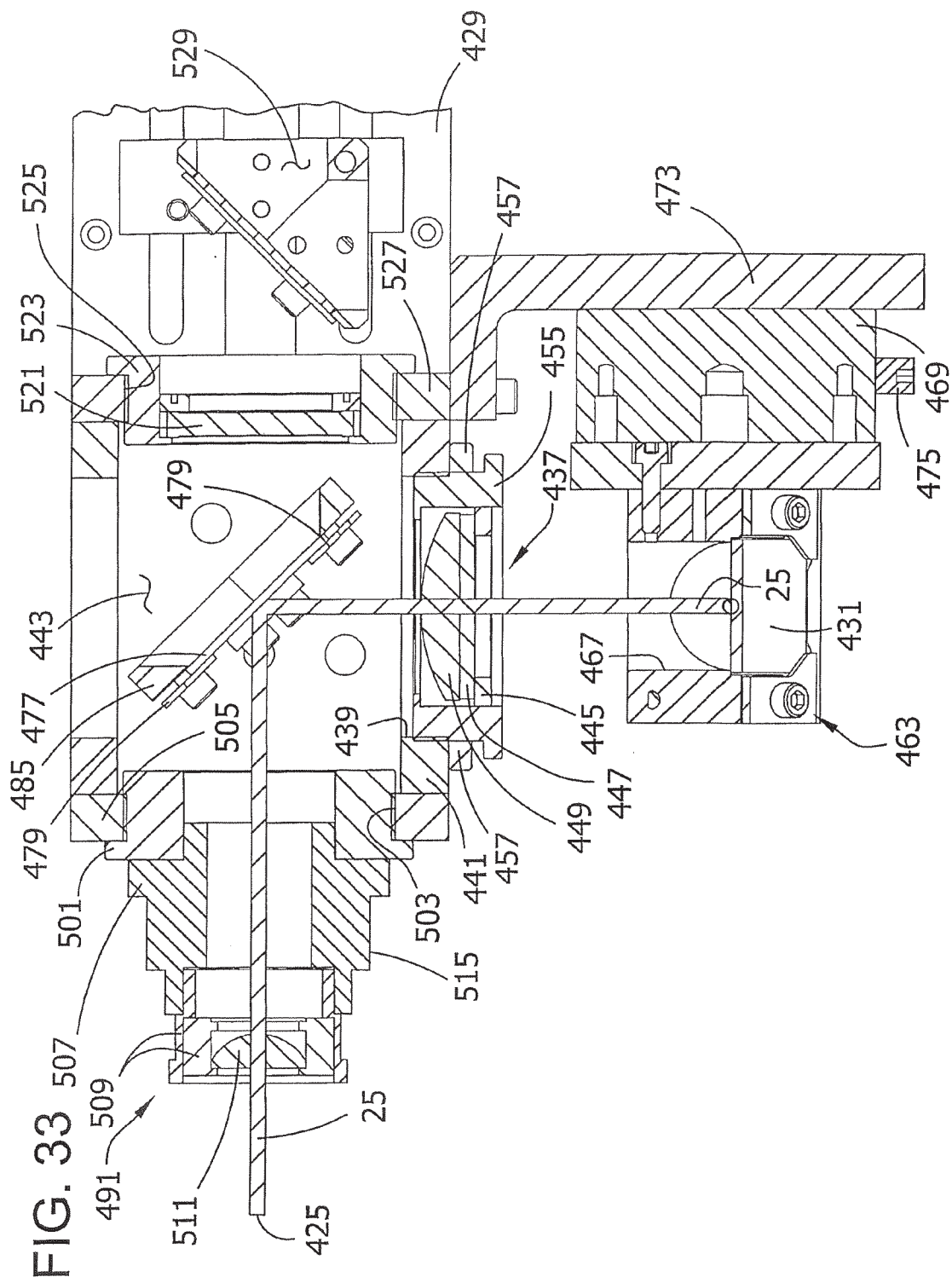


FIG. 30







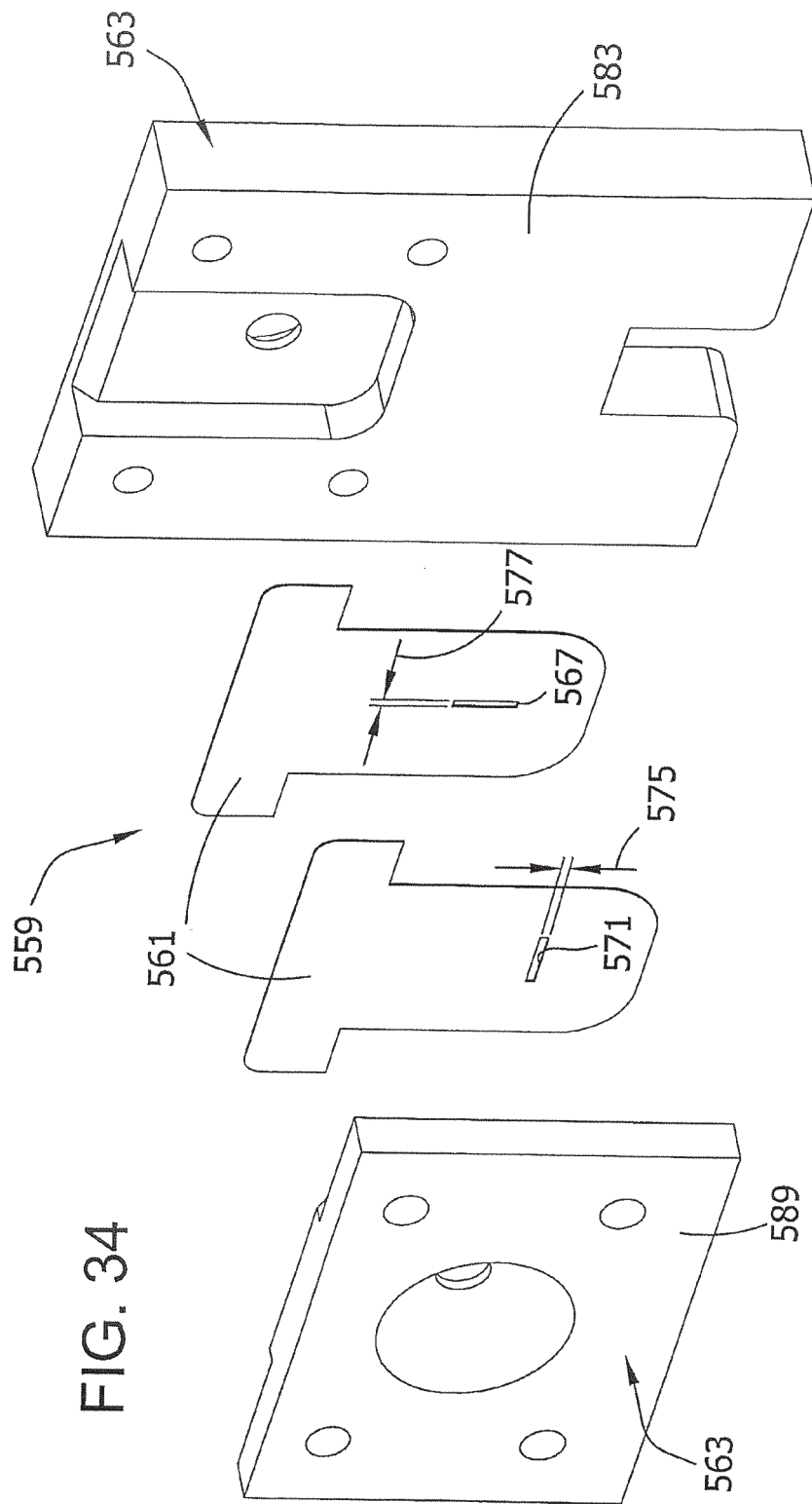


FIG. 35

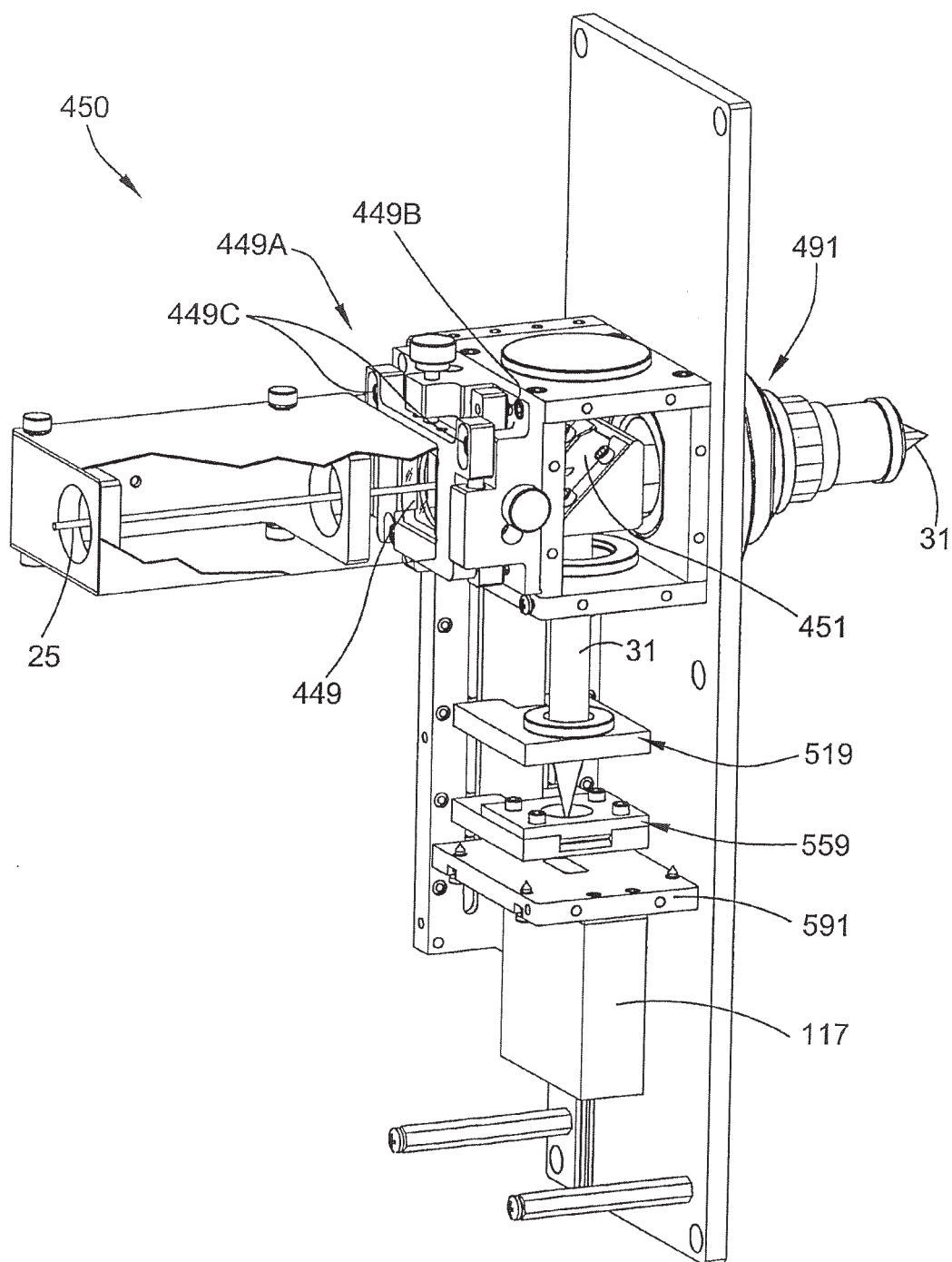


FIG. 36

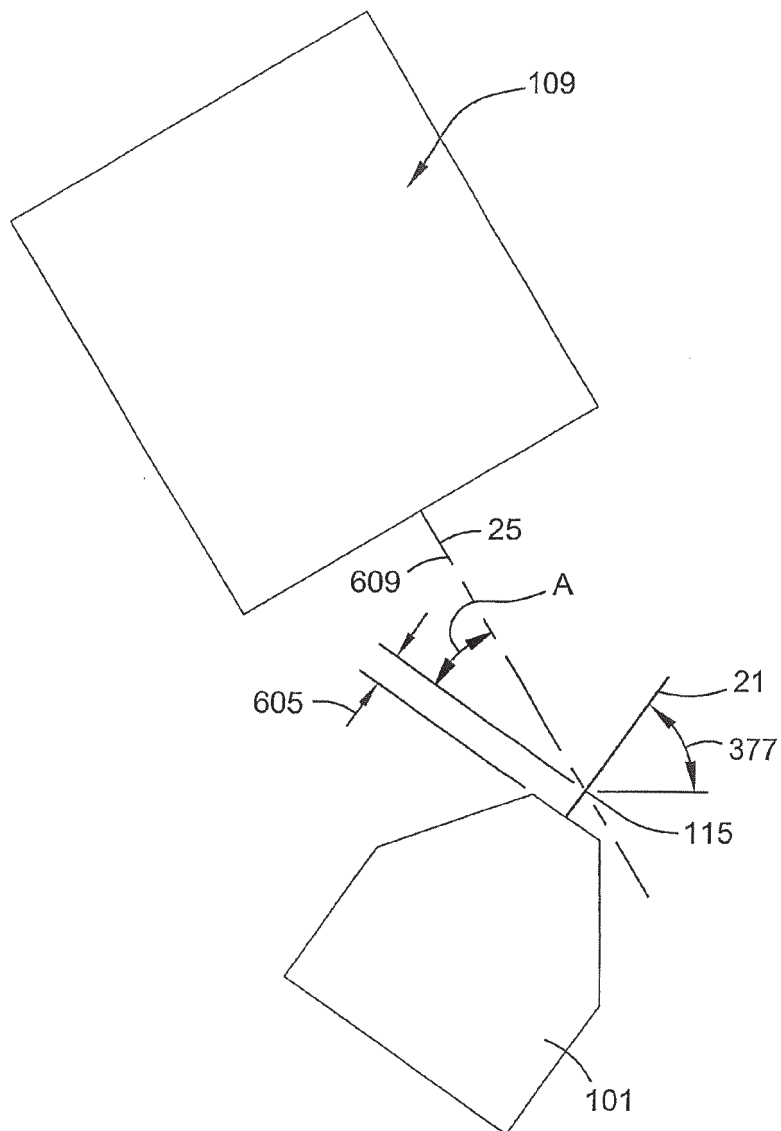


FIG. 37

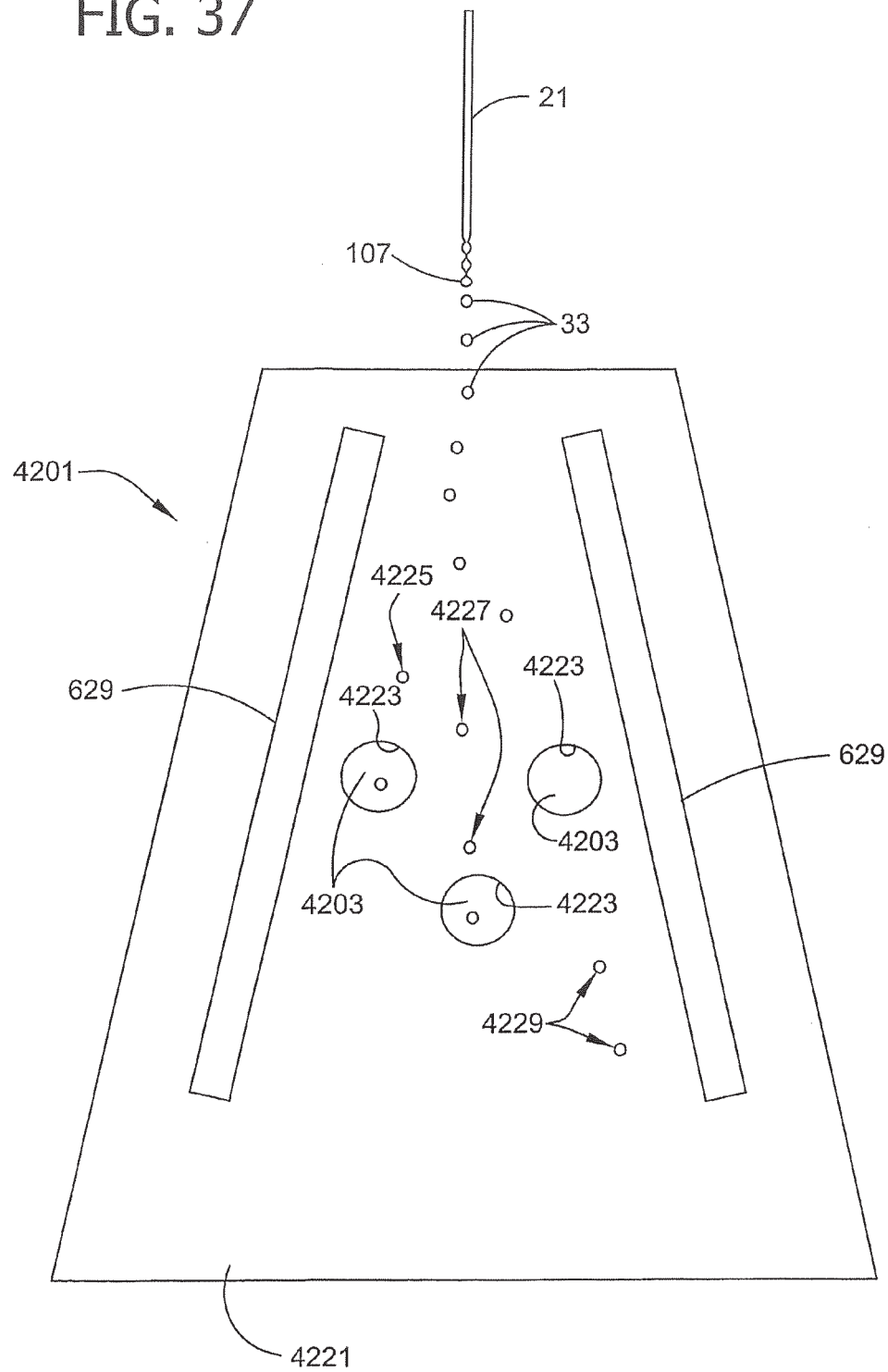


FIG. 38

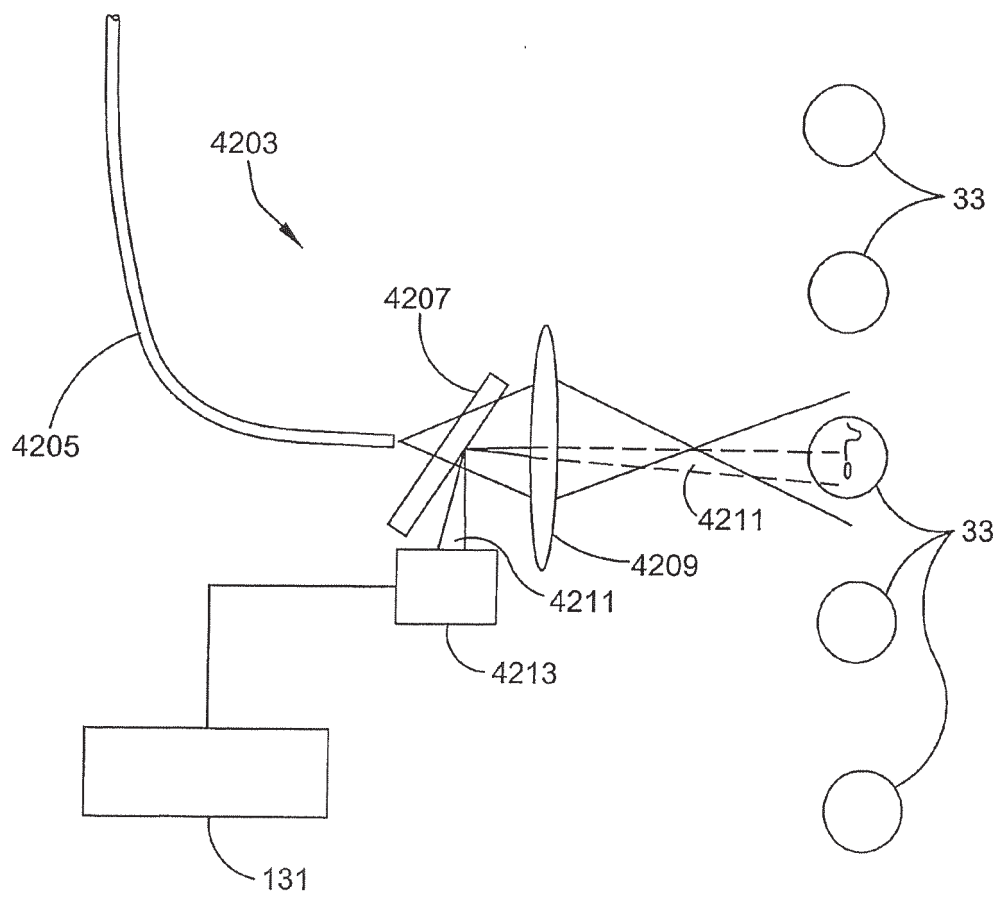


FIG. 39

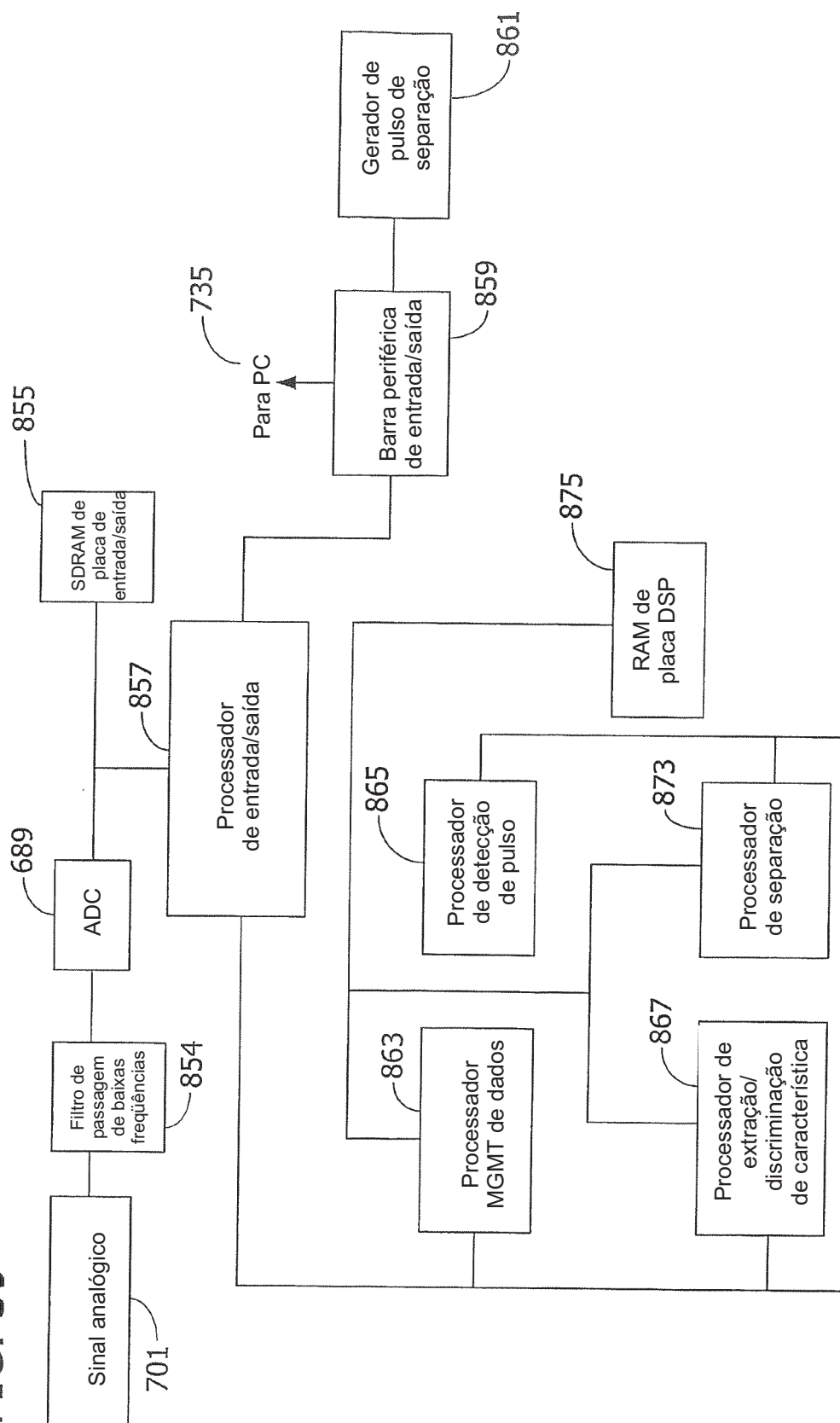
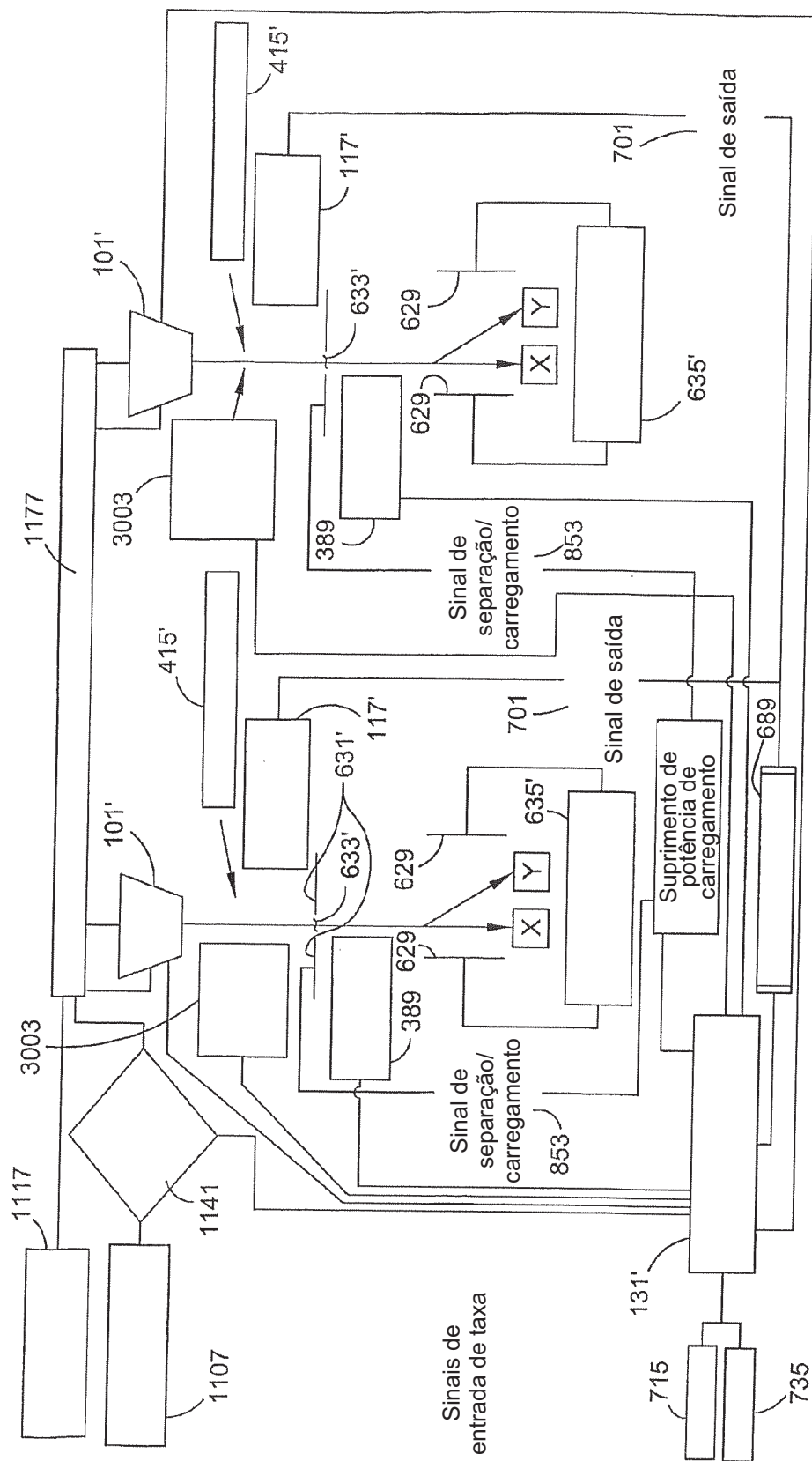


FIG. 40



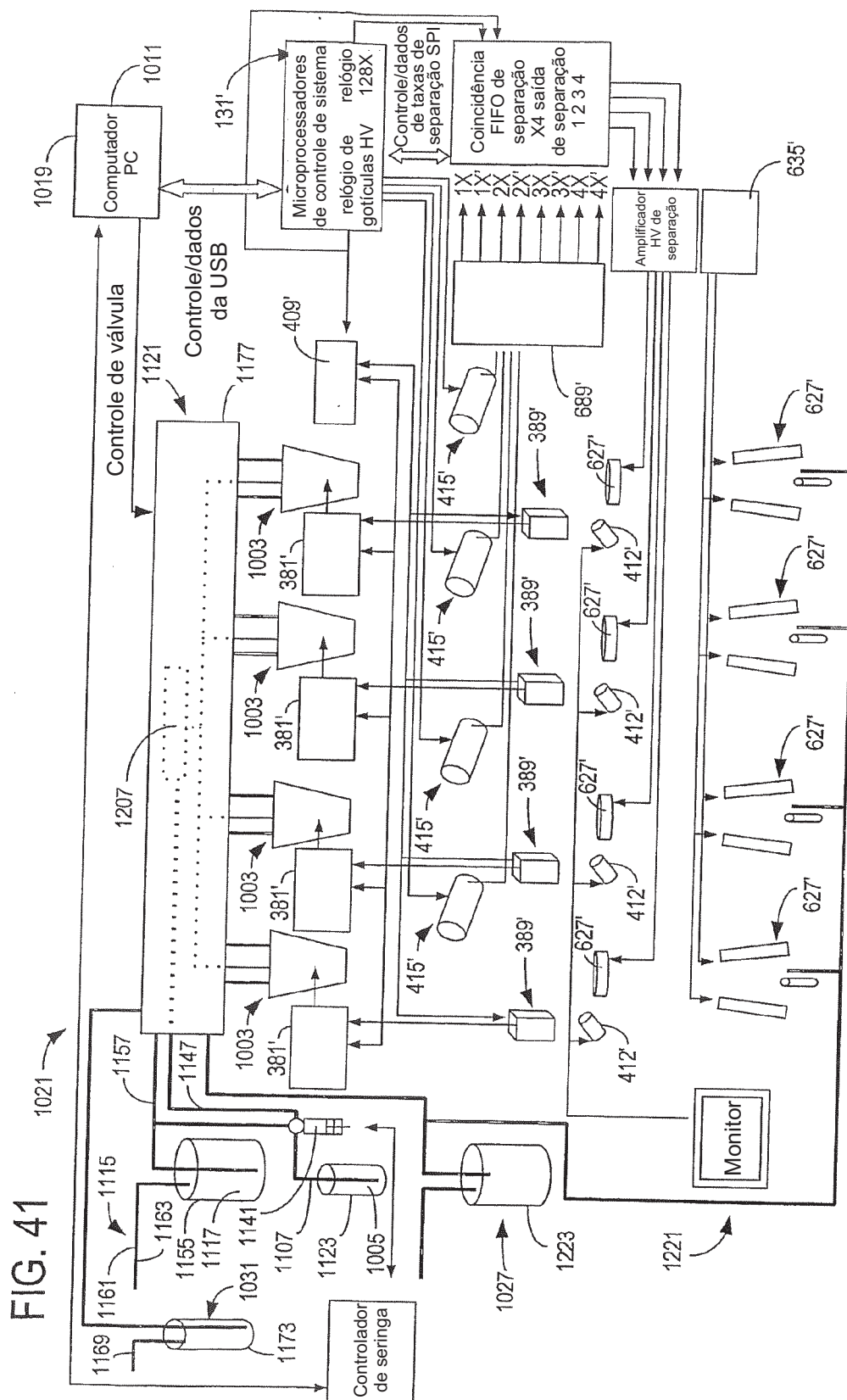


FIG. 42

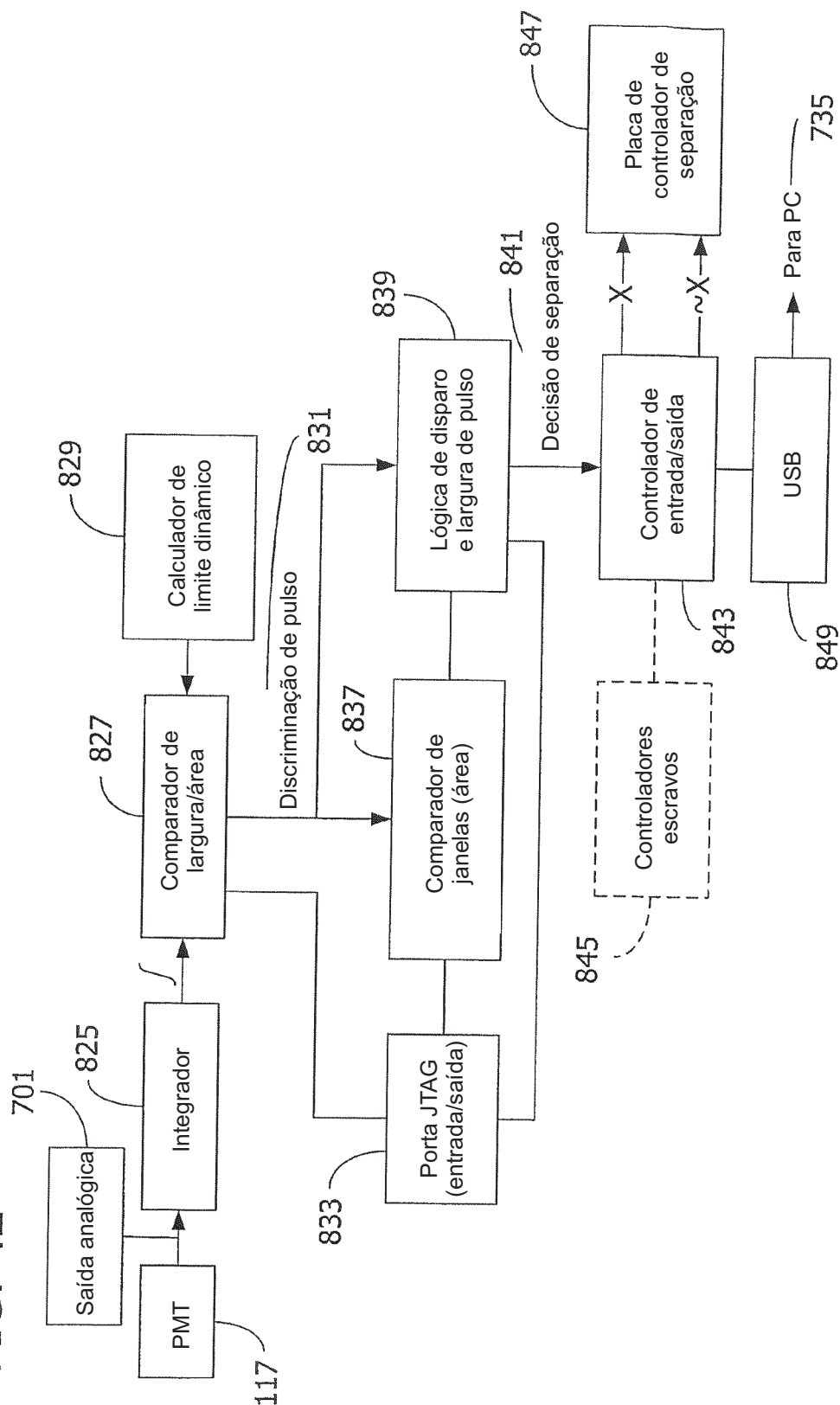
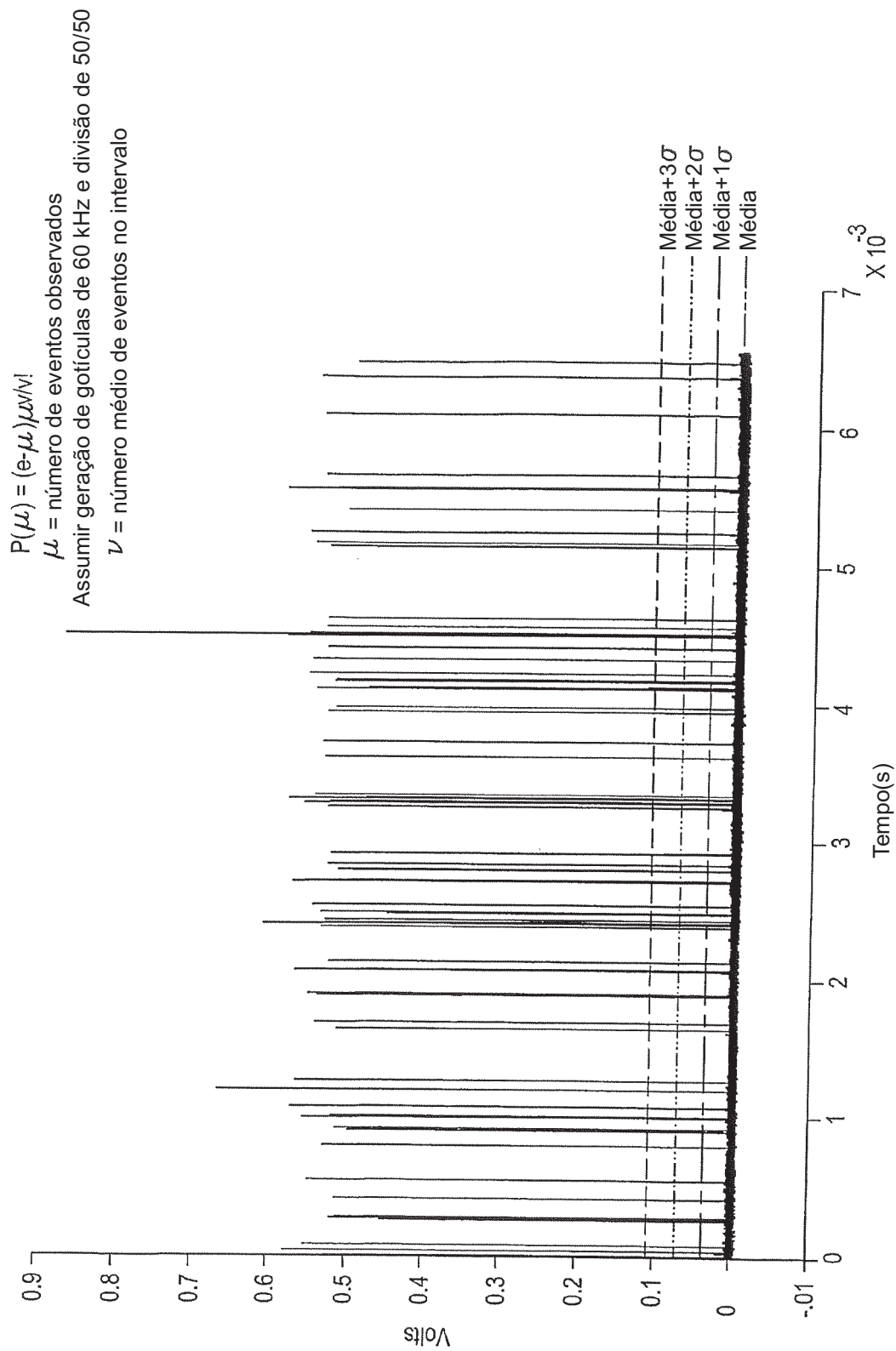
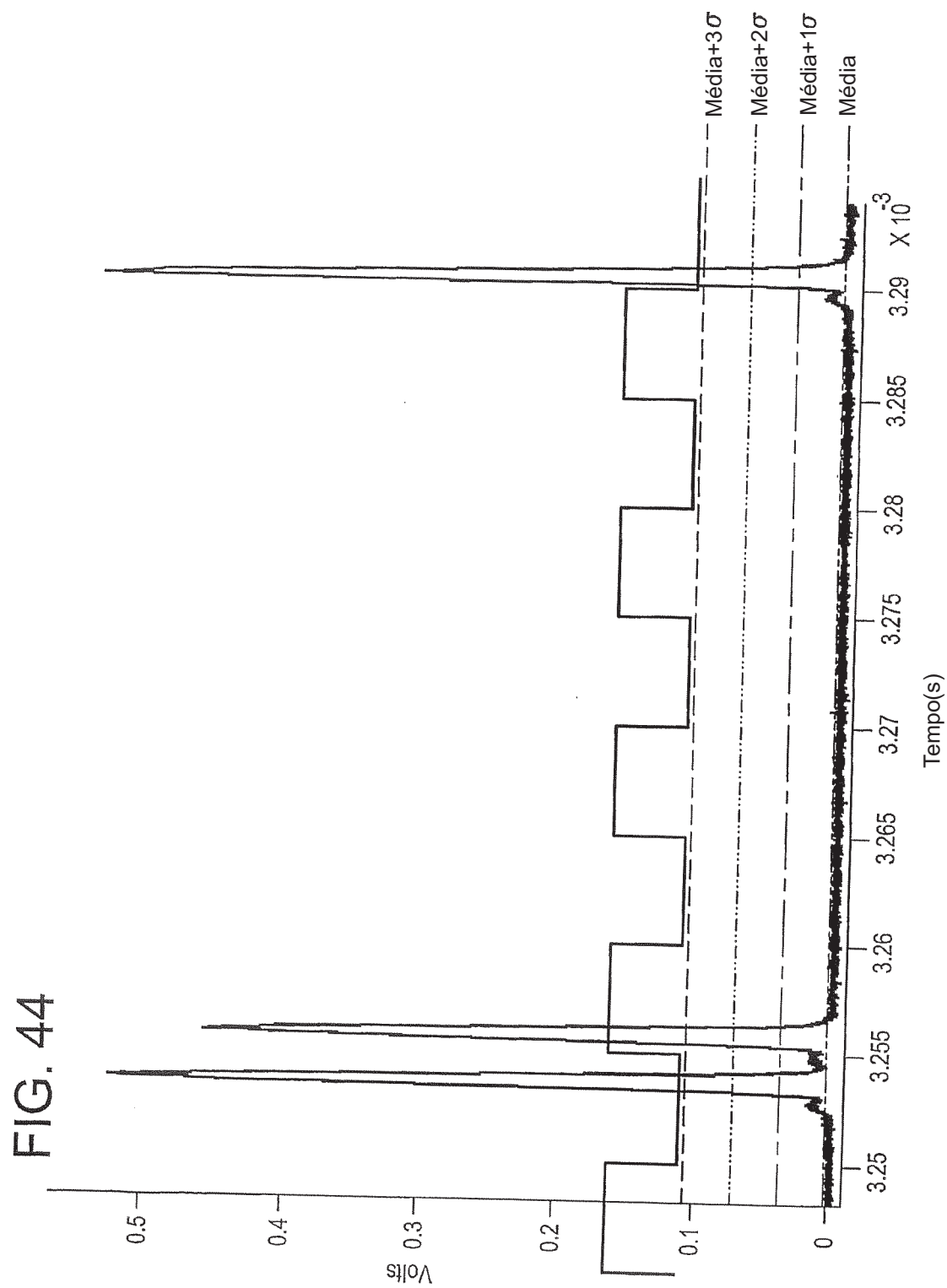
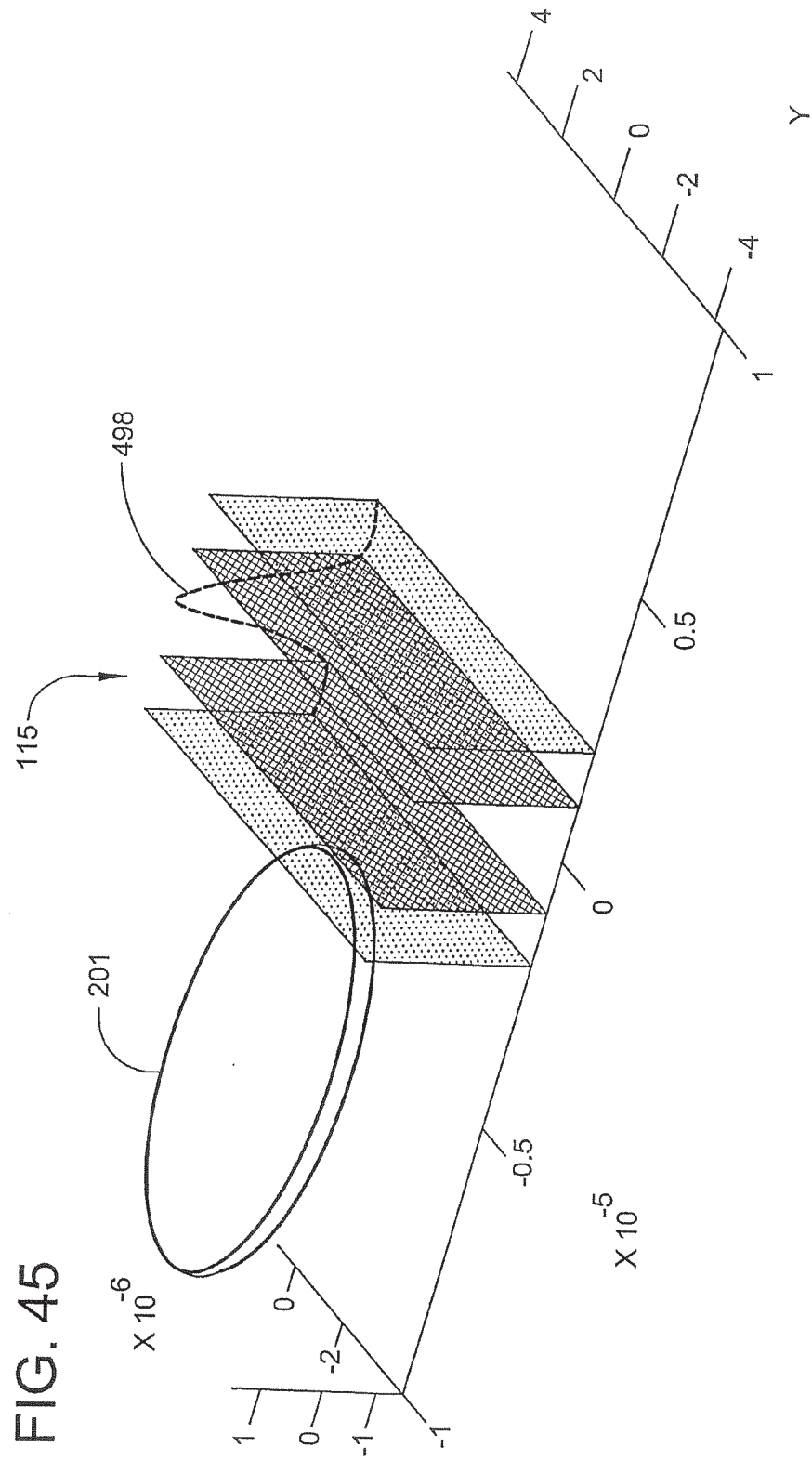


FIG. 43







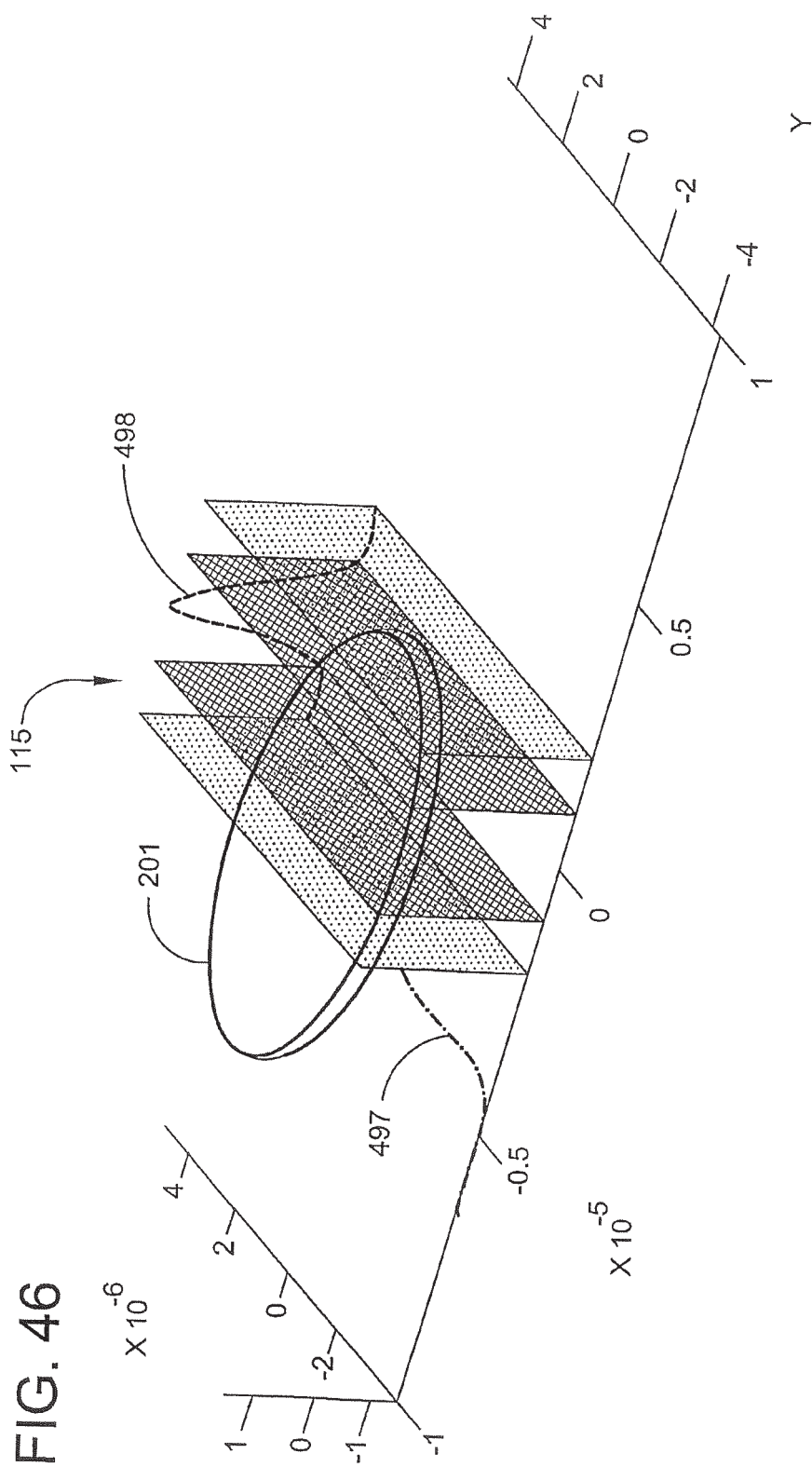
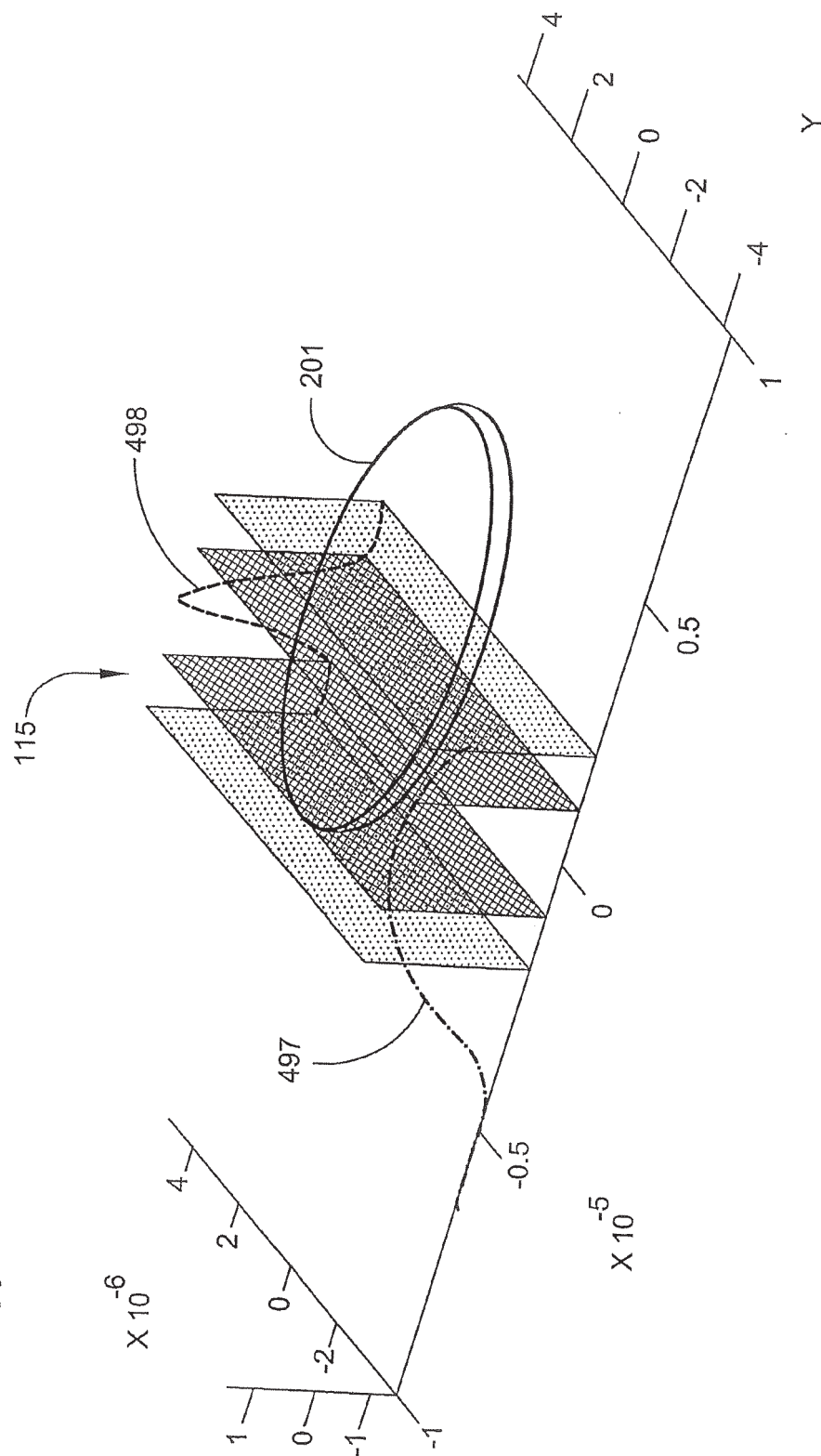
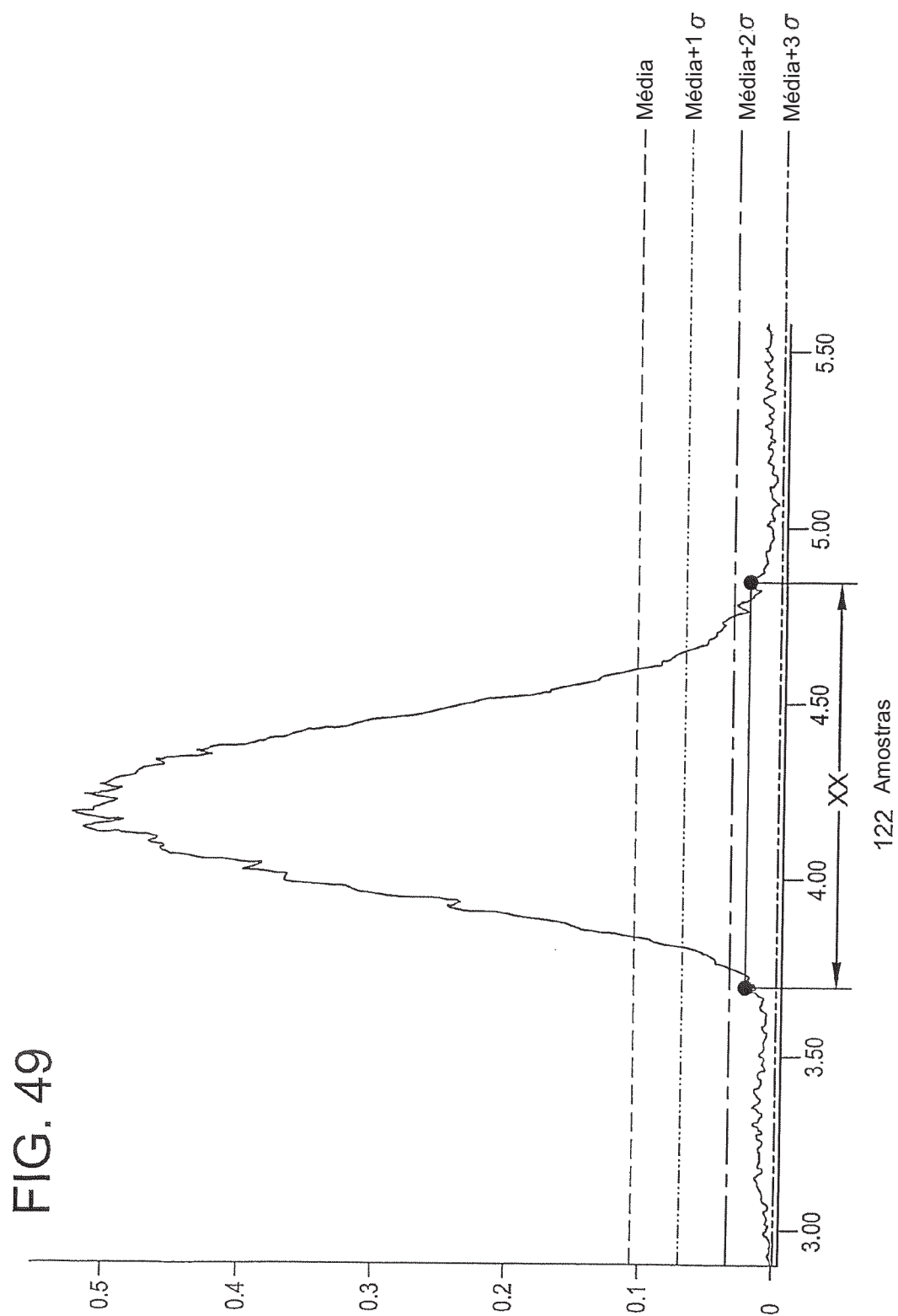
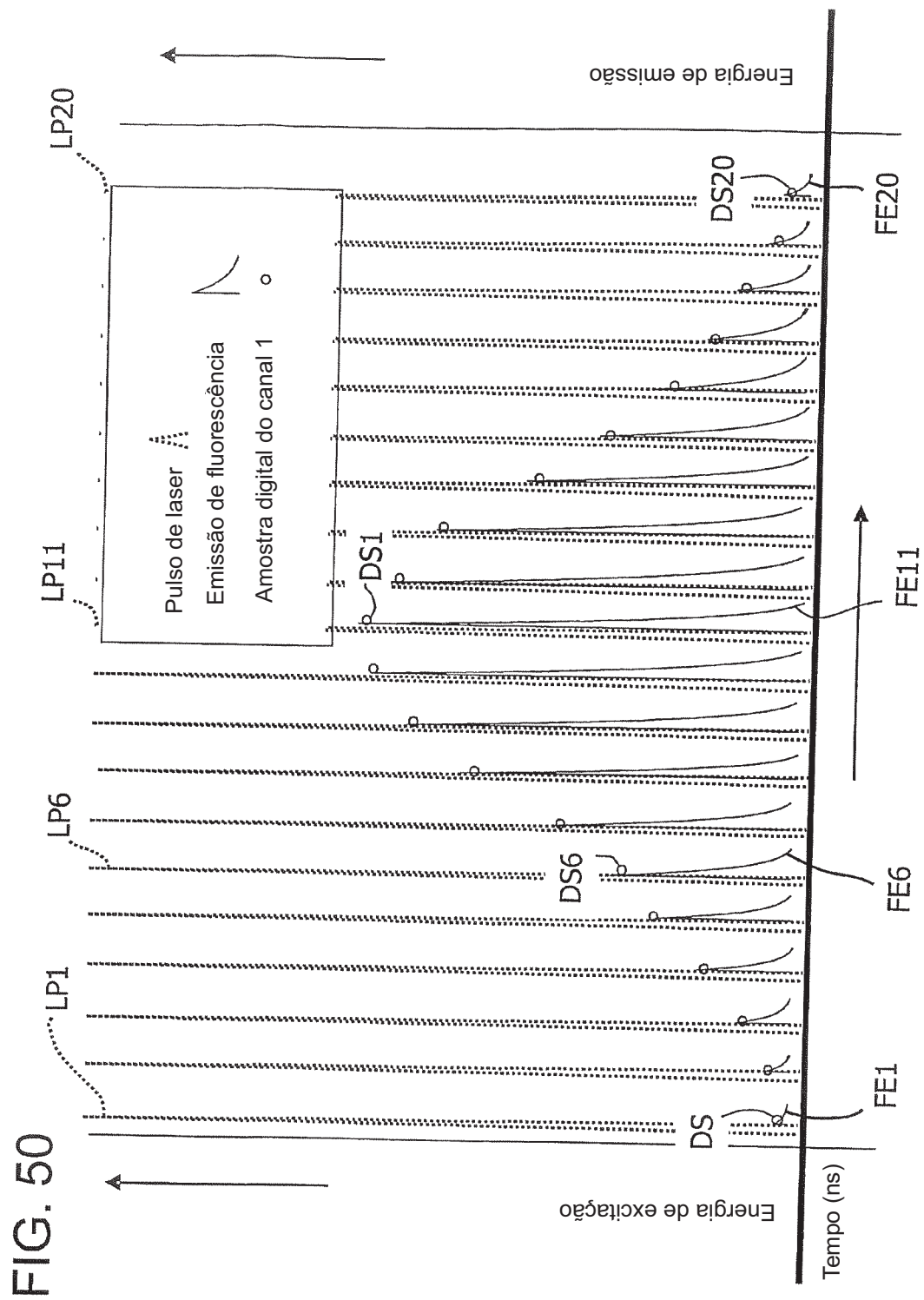
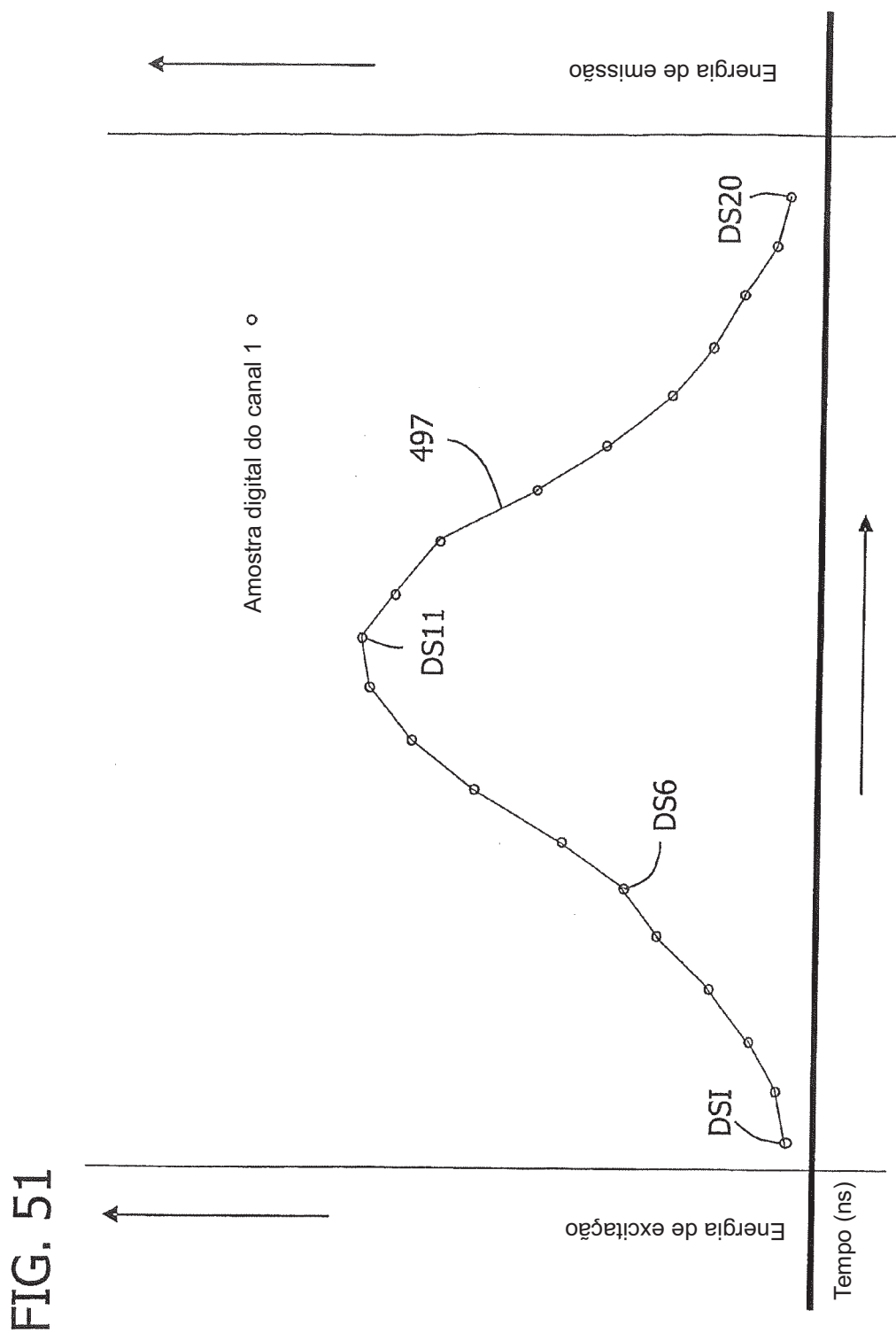


FIG. 47









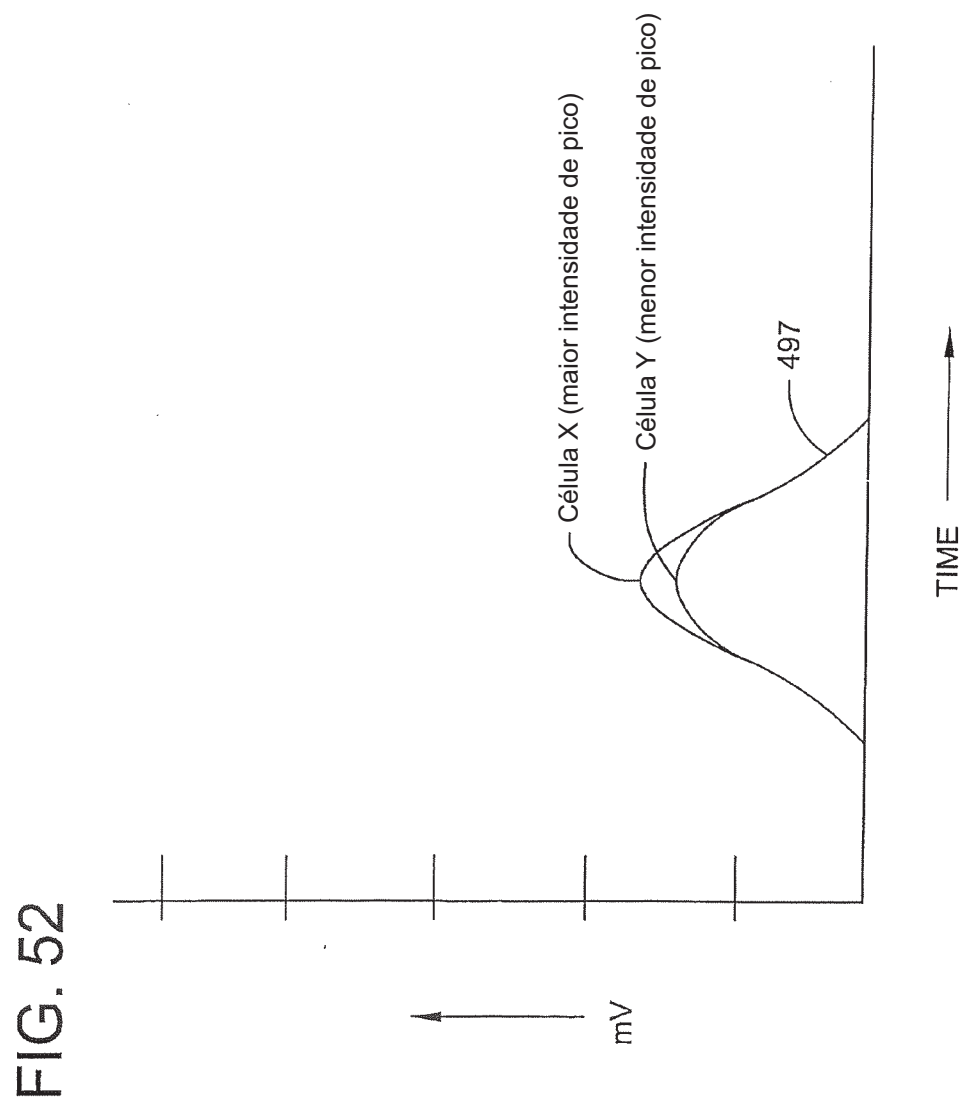
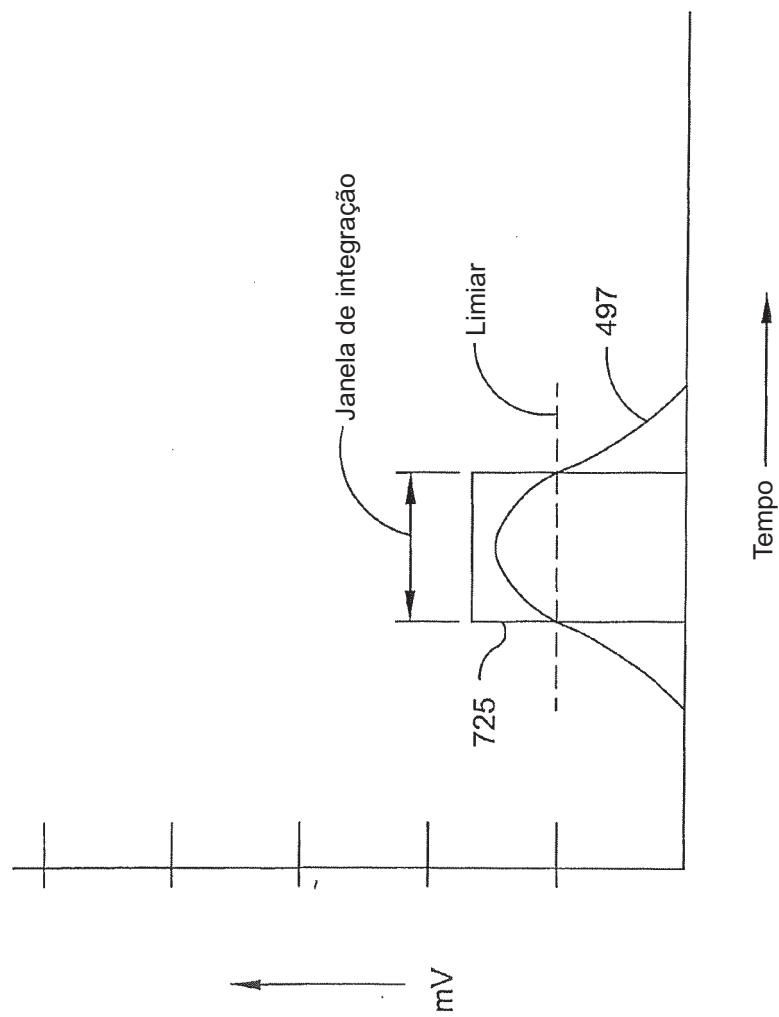
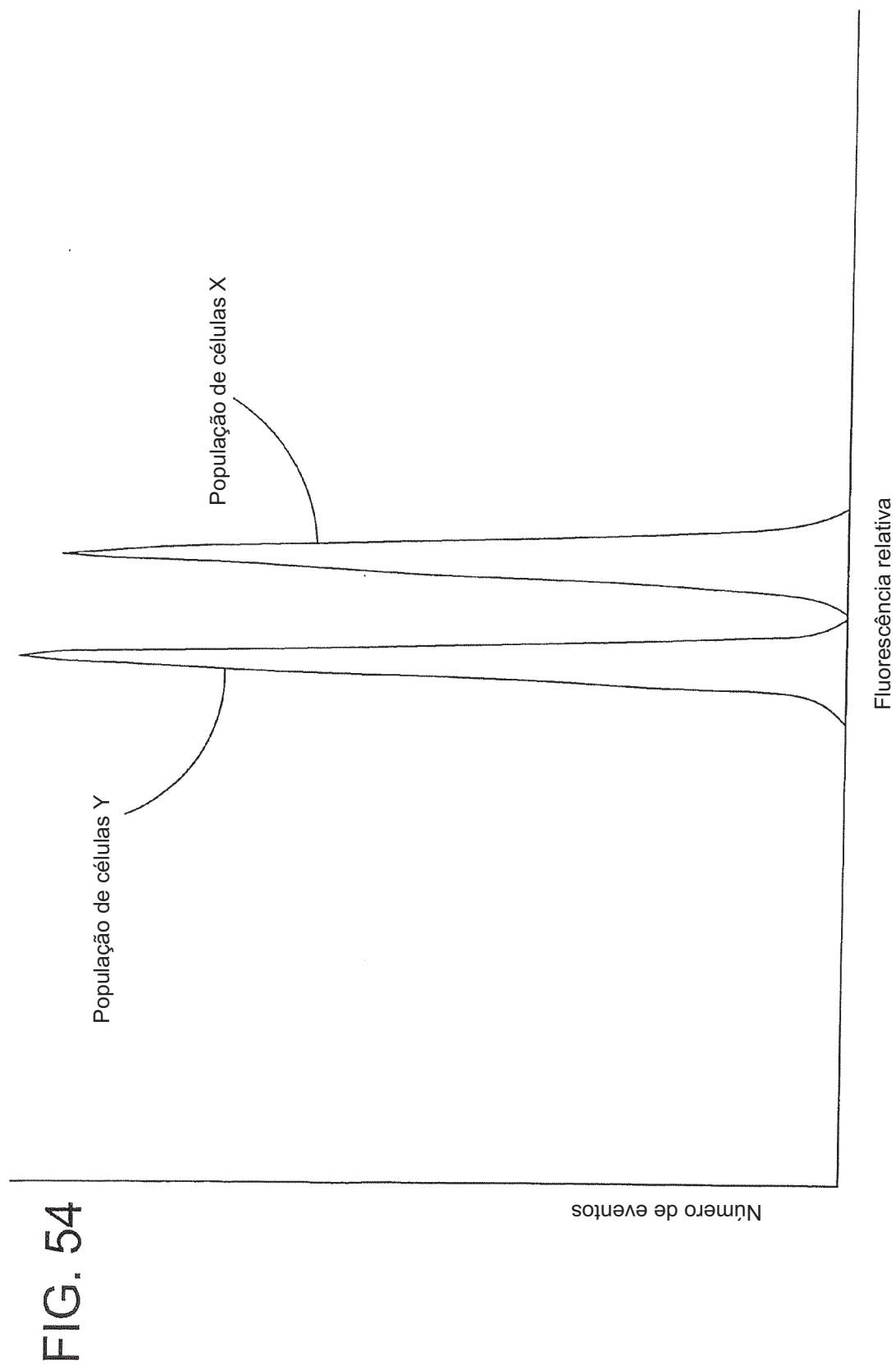


FIG. 53





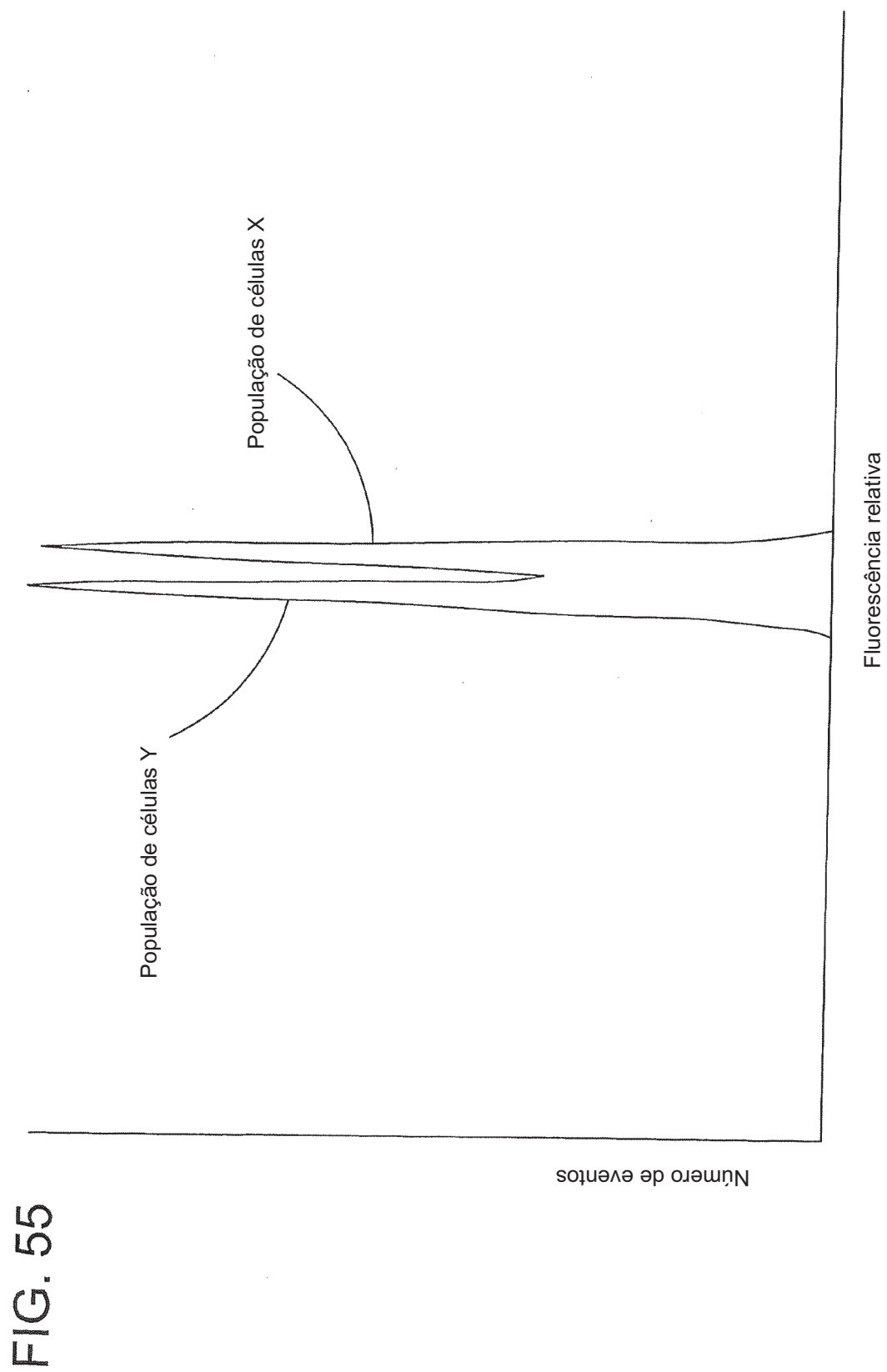


FIG. 57

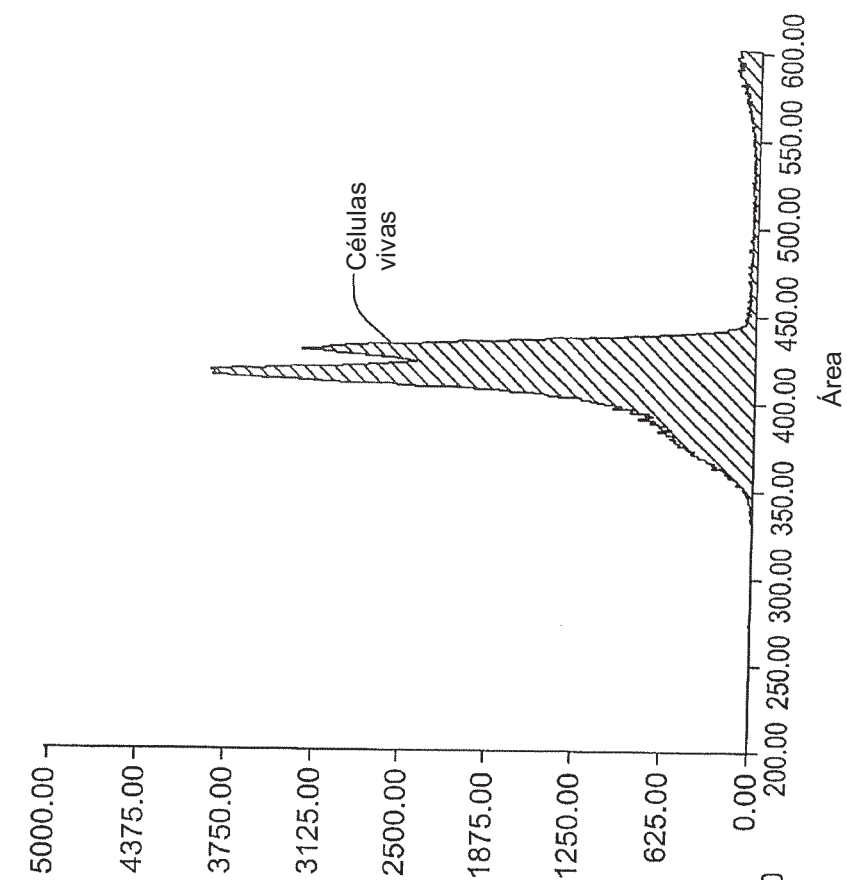


FIG. 56

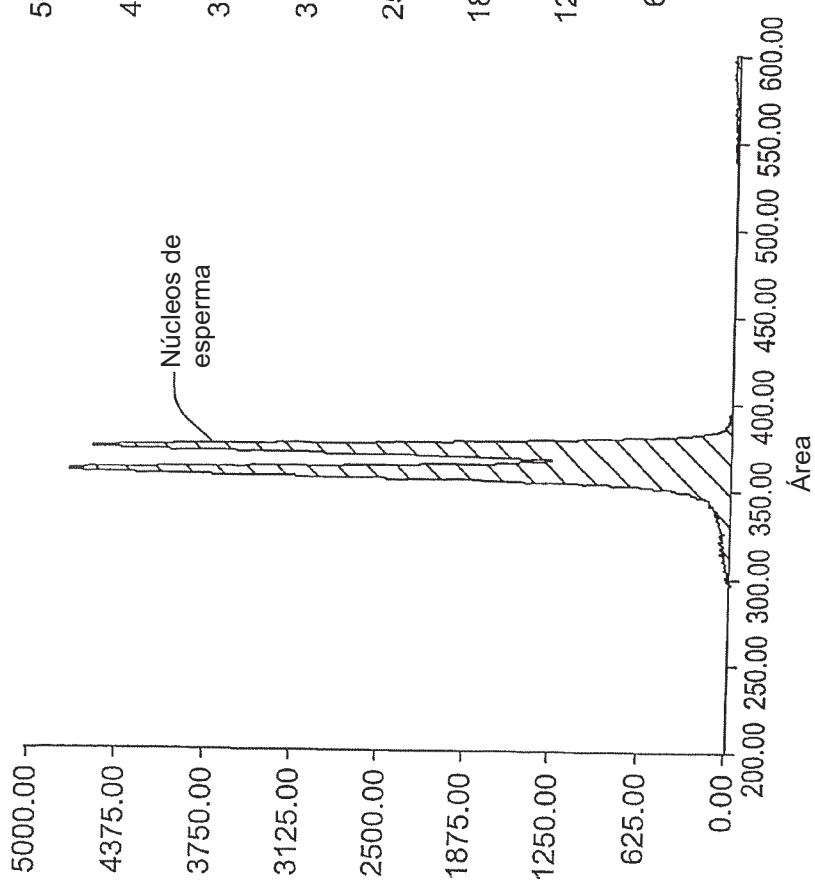


FIG. 59

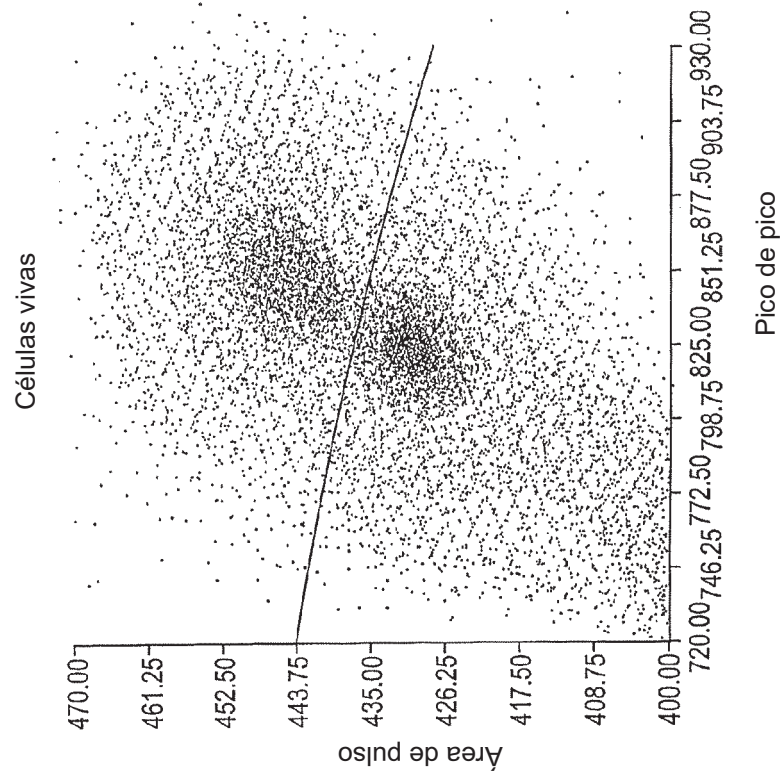


FIG. 58

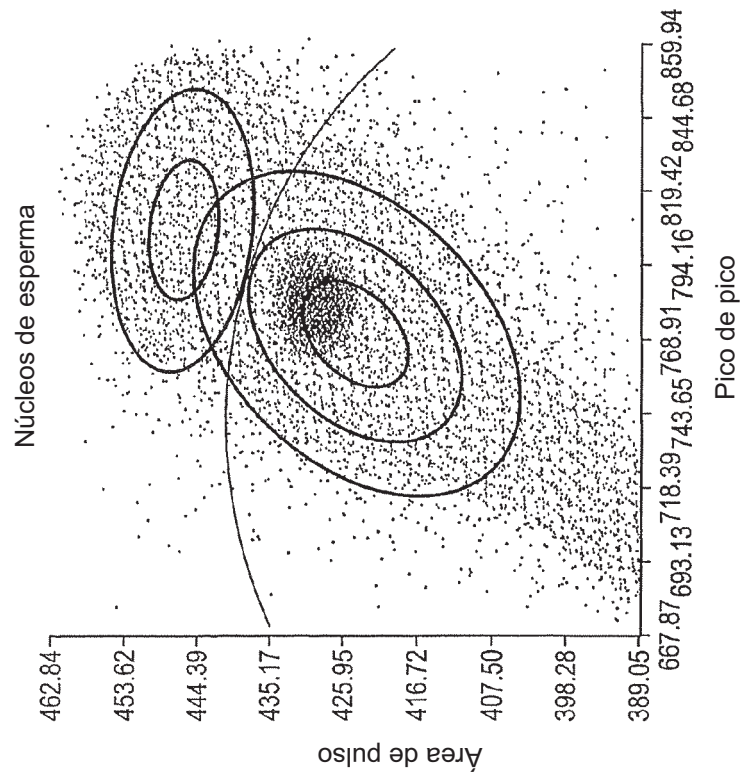


FIG. 60

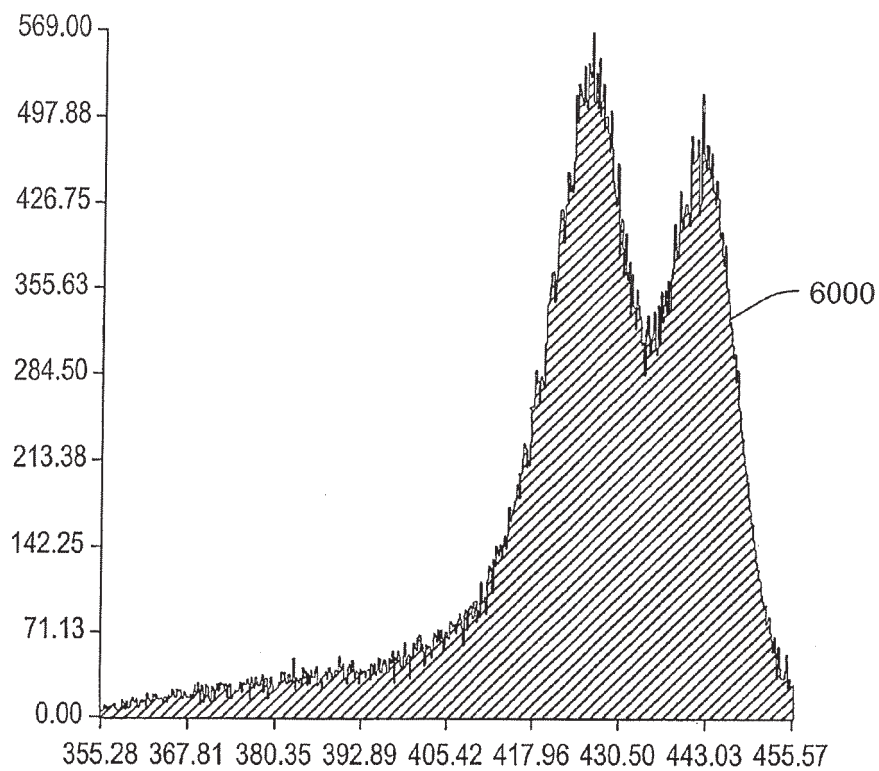


FIG. 61

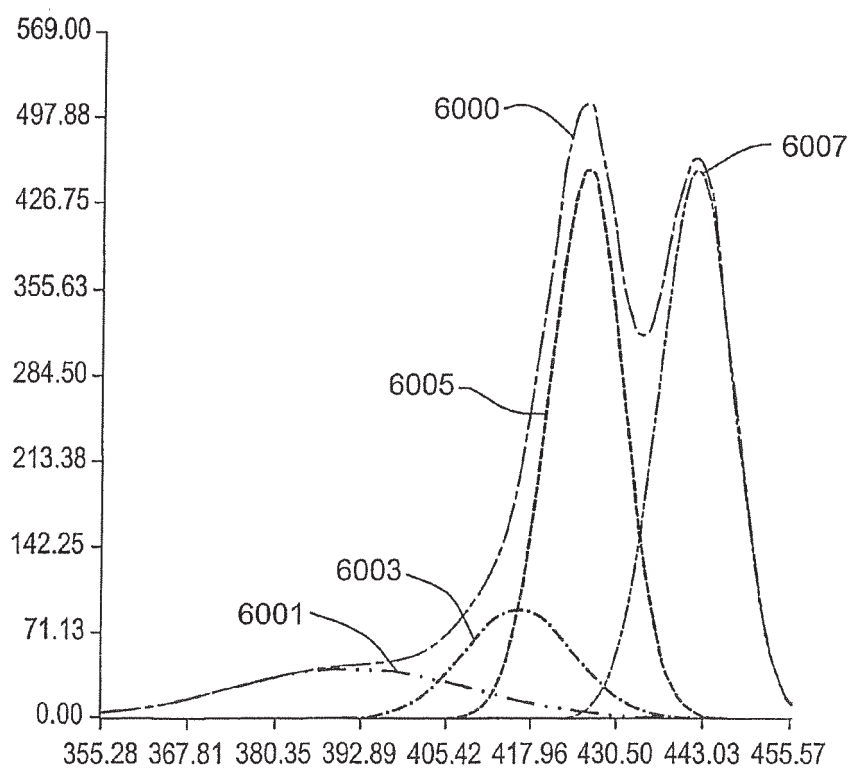


FIG. 62

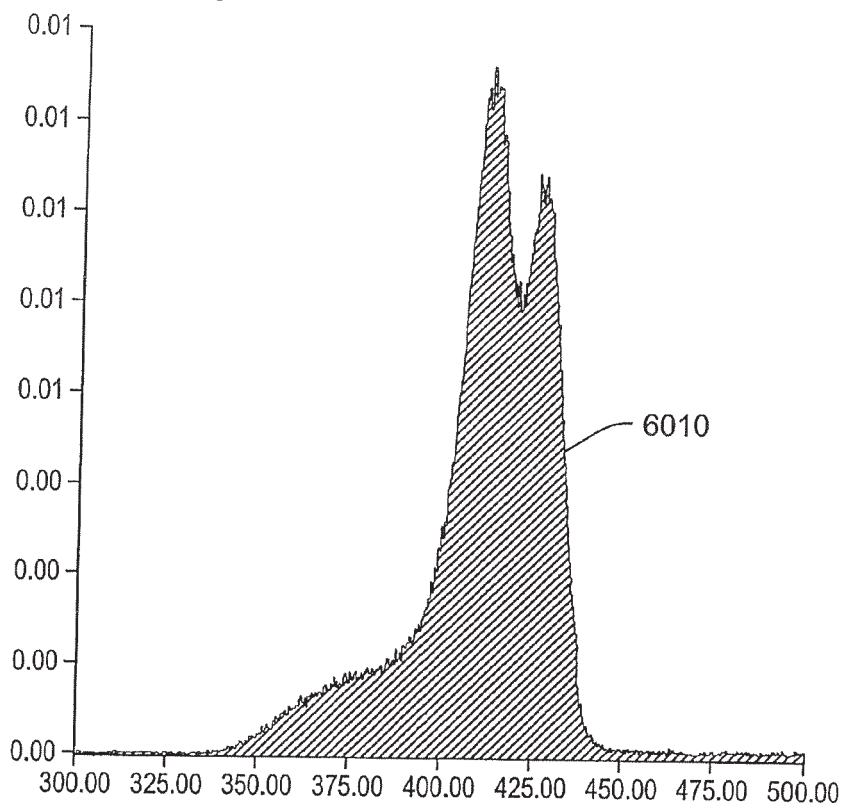


FIG. 63

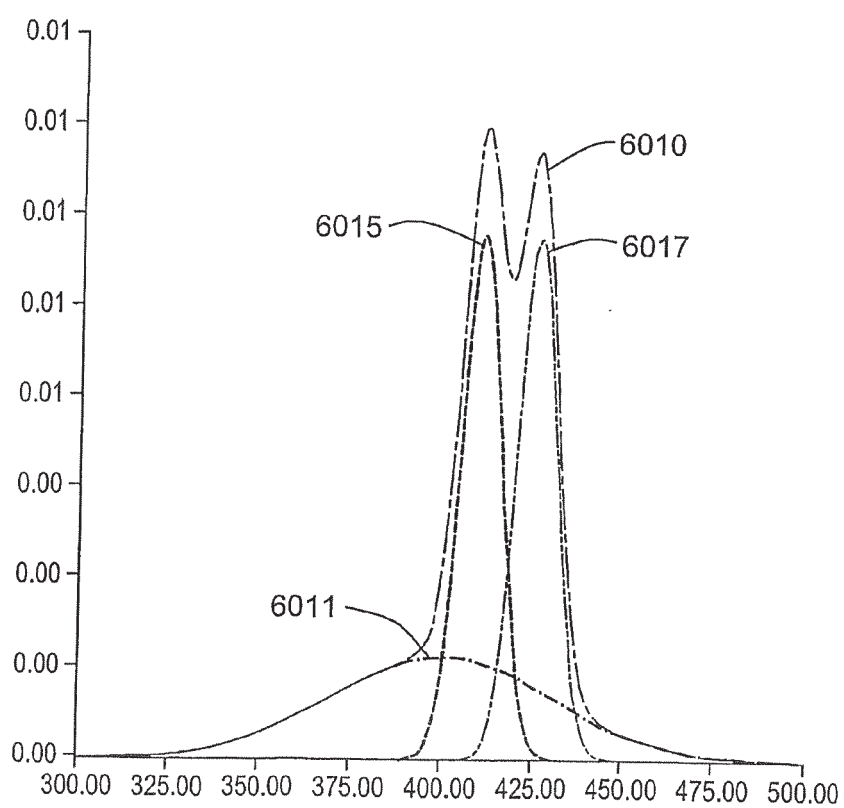


FIG. 64

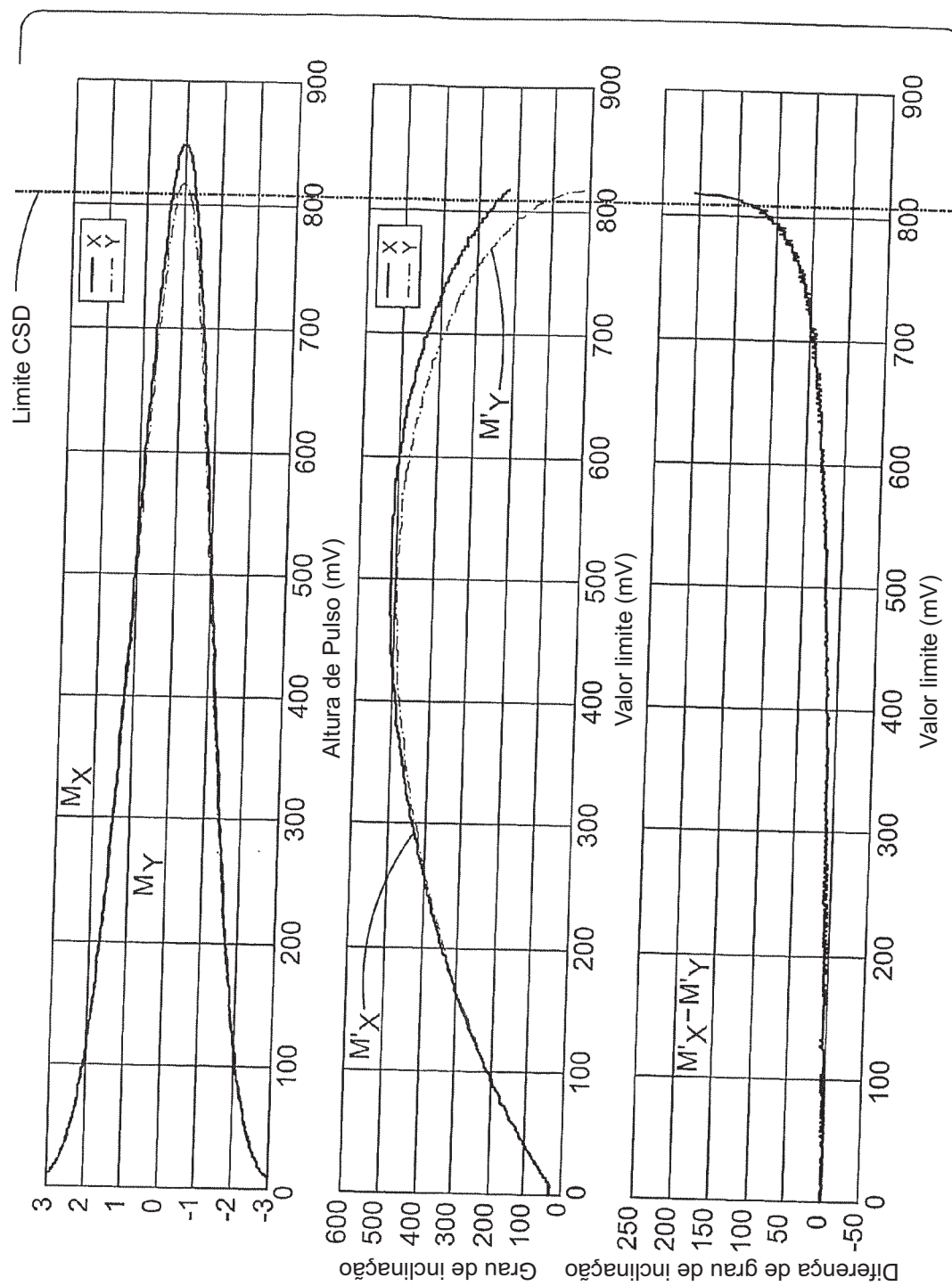


FIG. 65

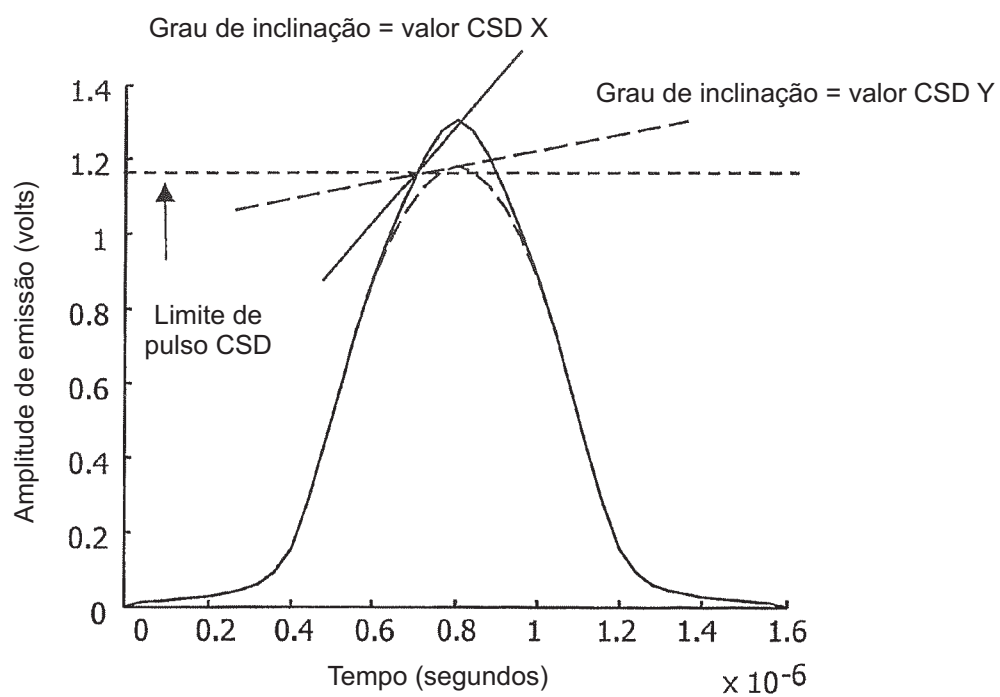


FIG. 67

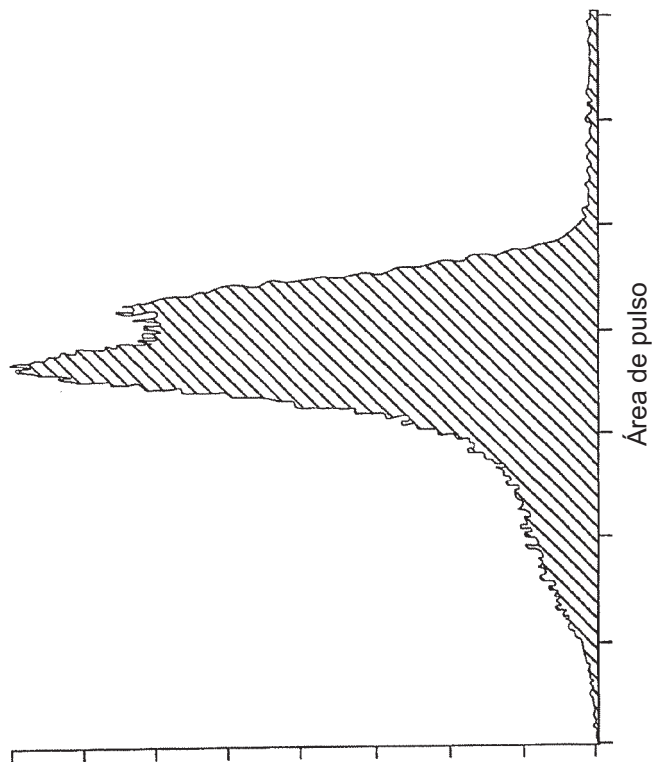


FIG. 66

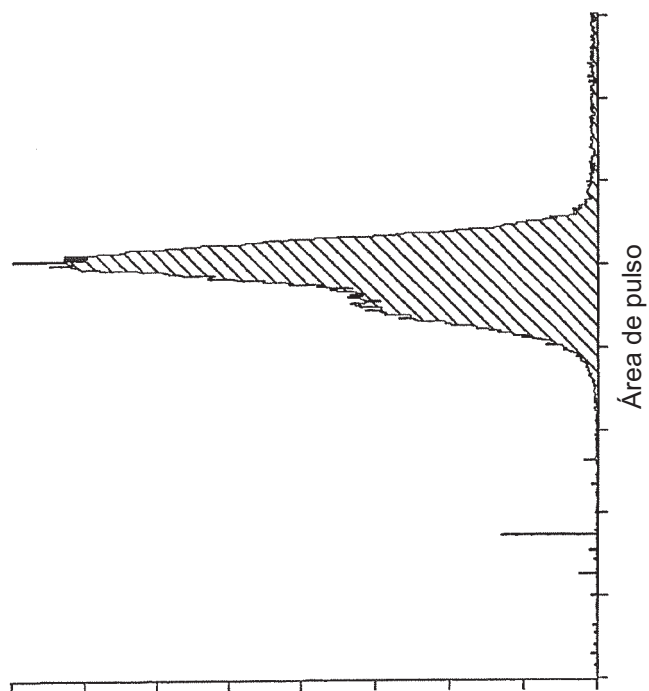


FIG. 68

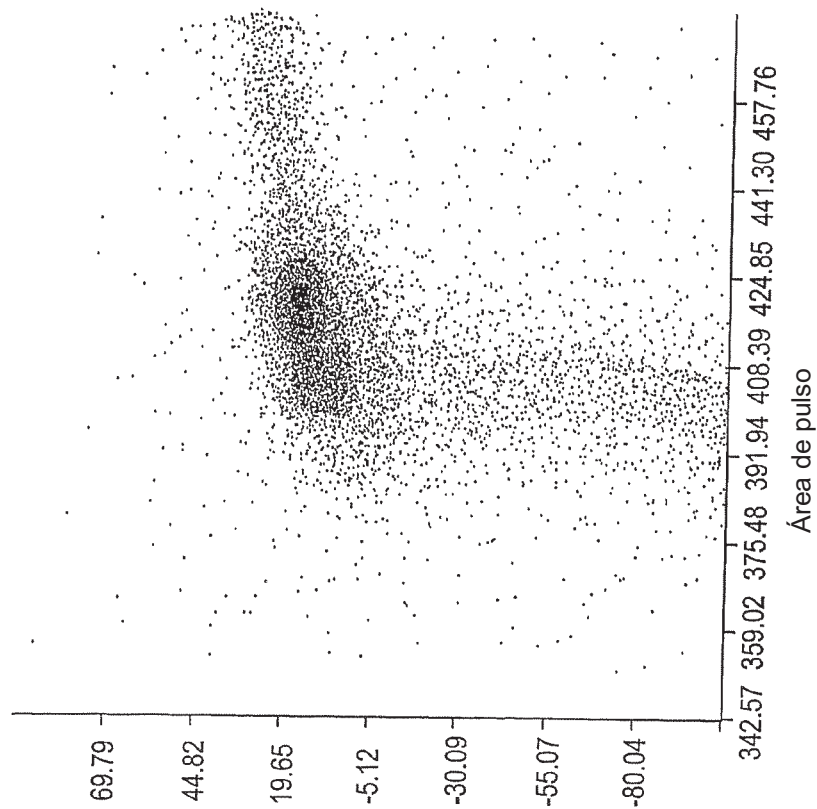


FIG. 69

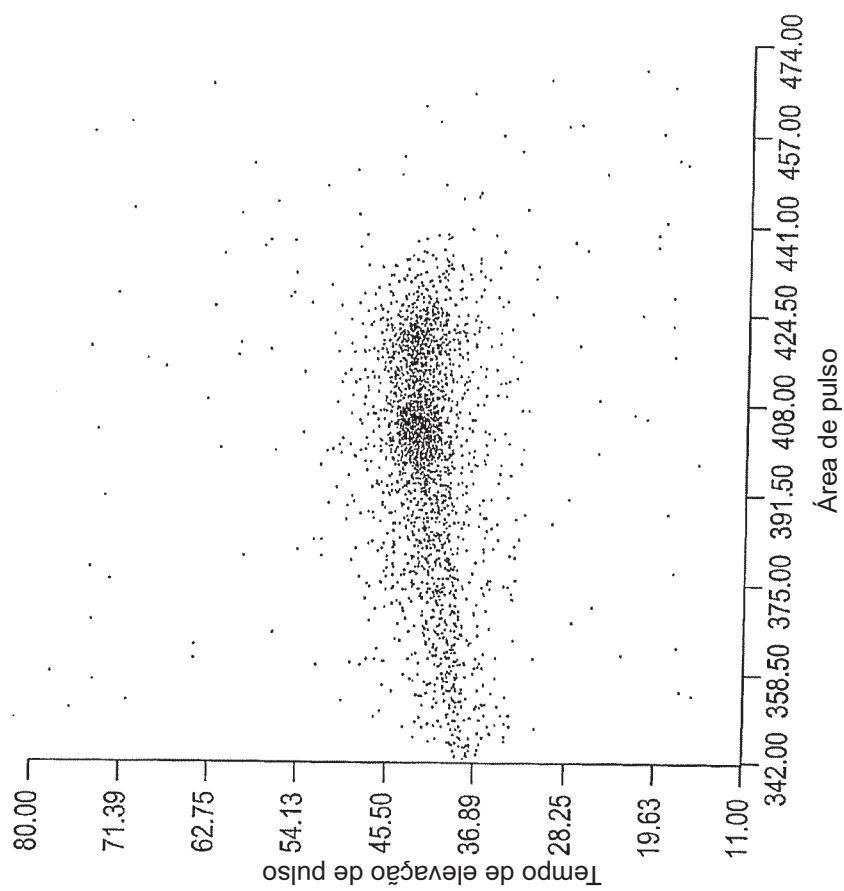
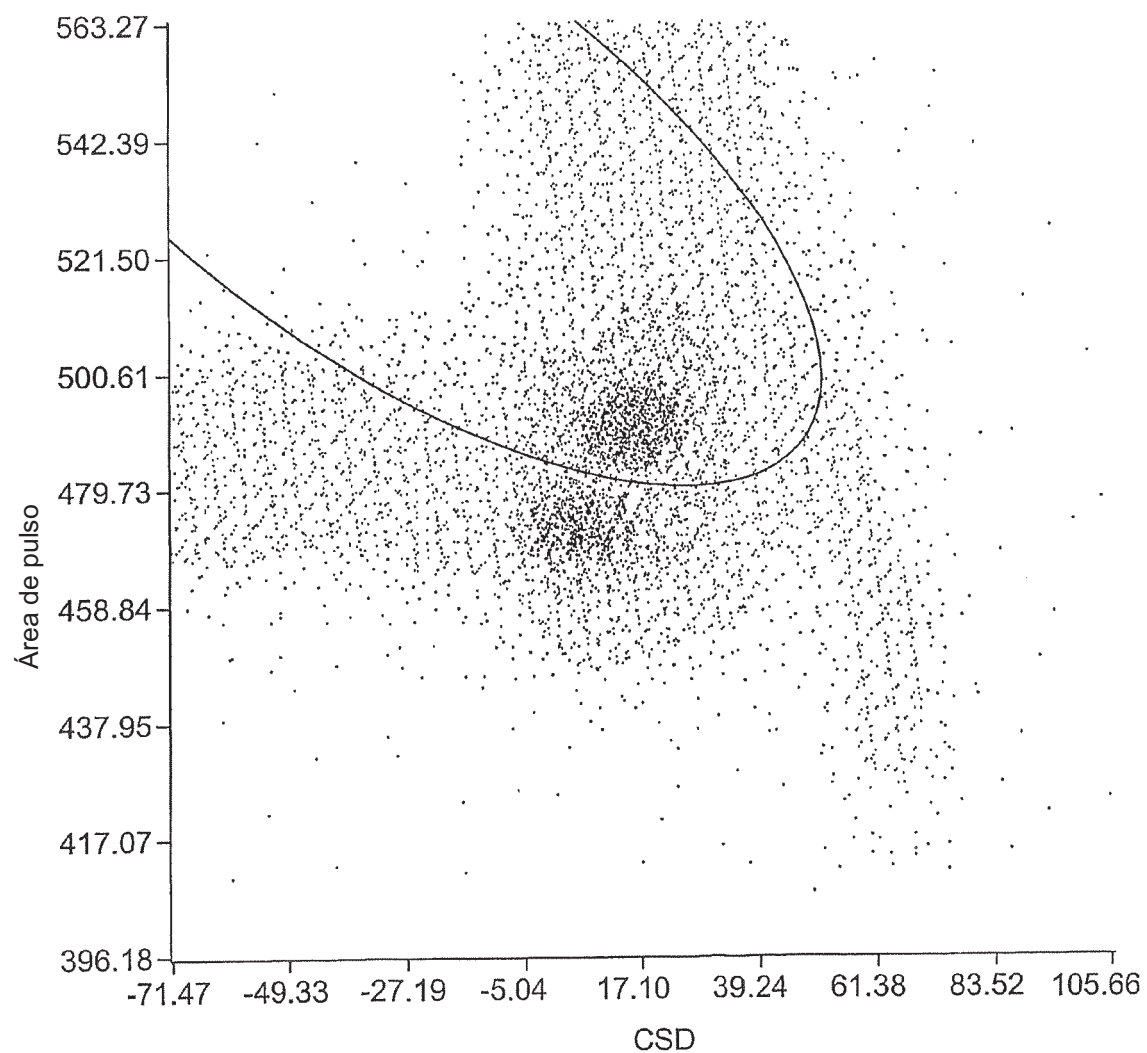


FIG. 70



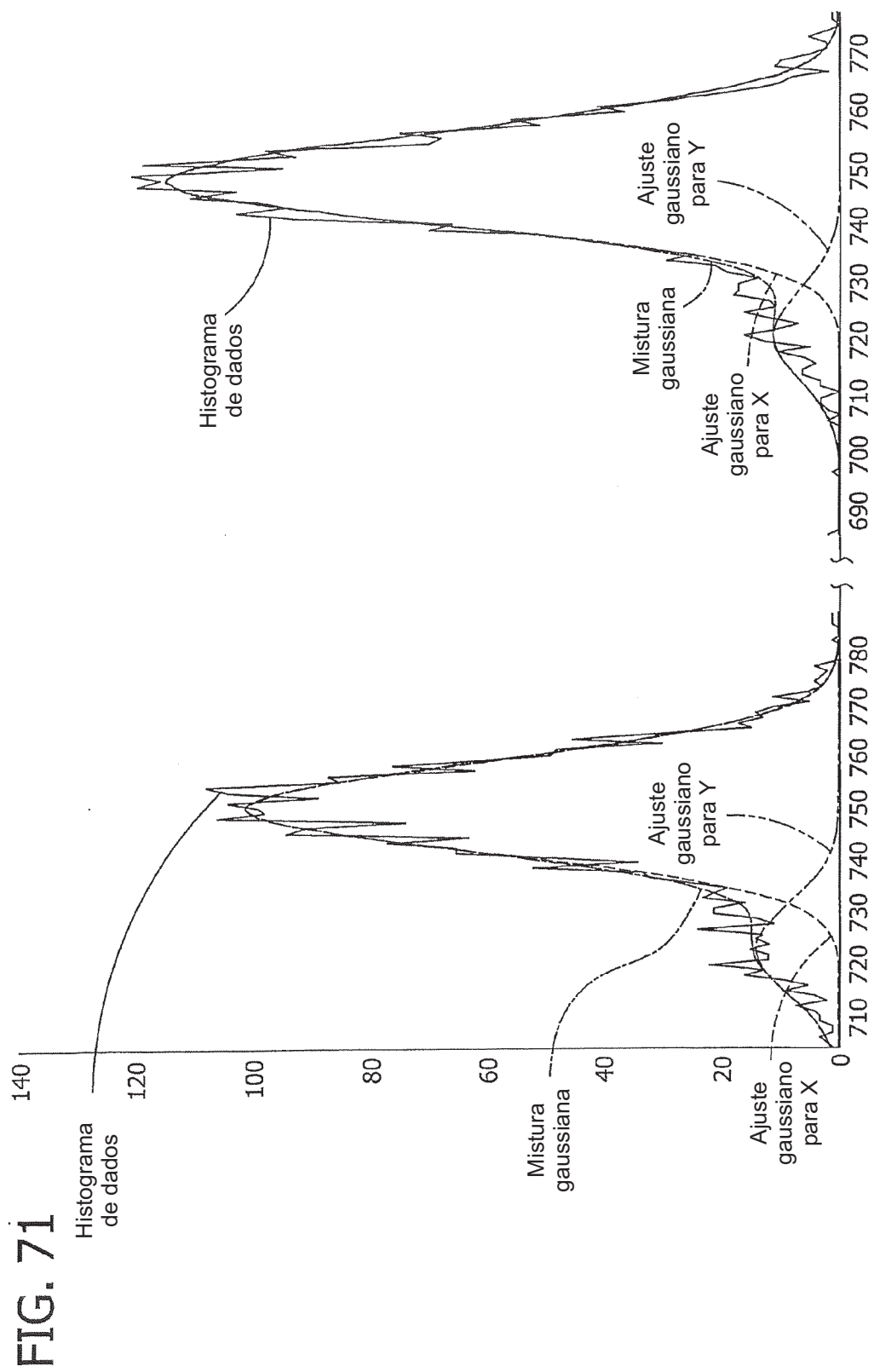


FIG. 72

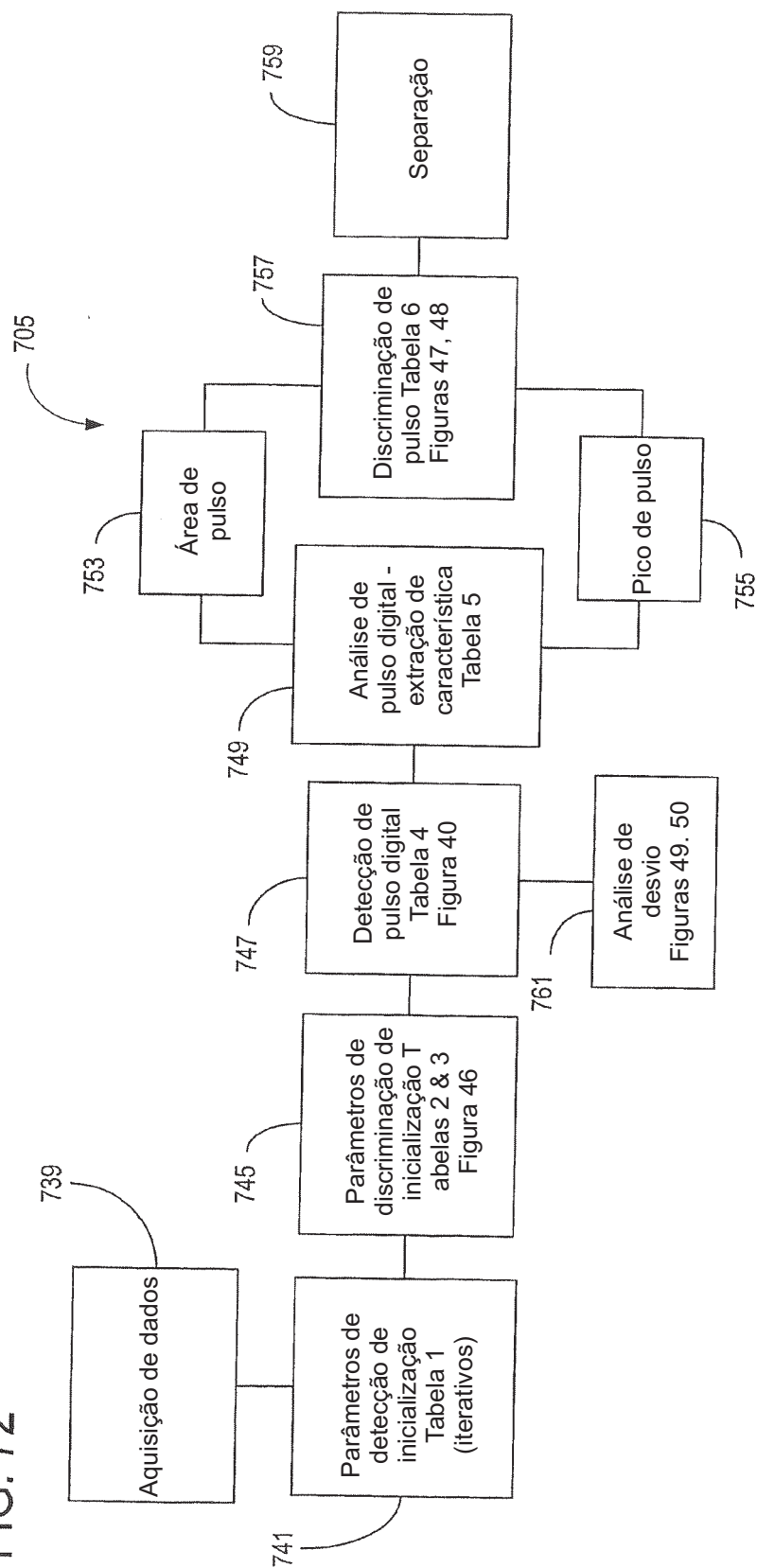


FIG. 73

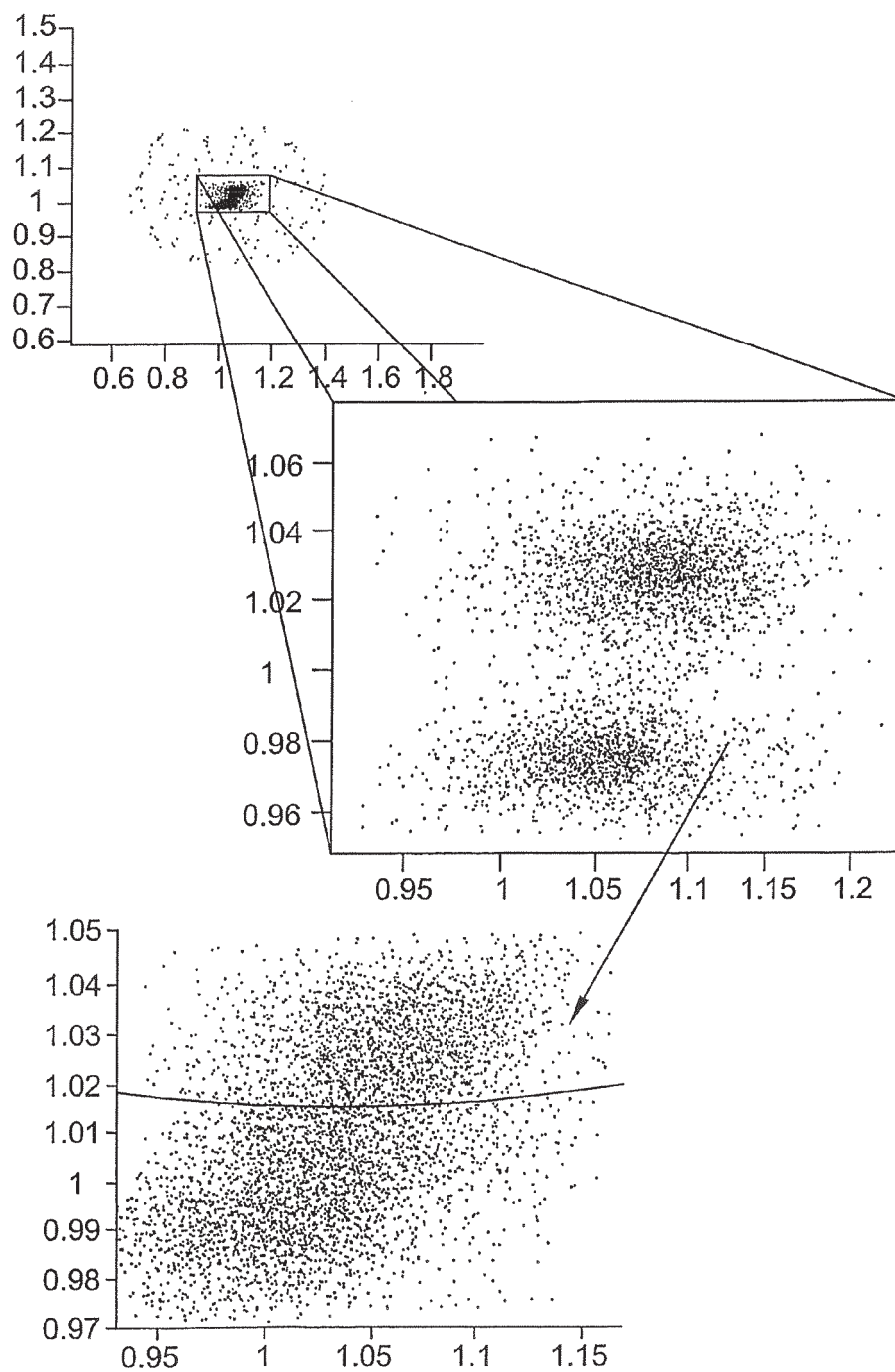
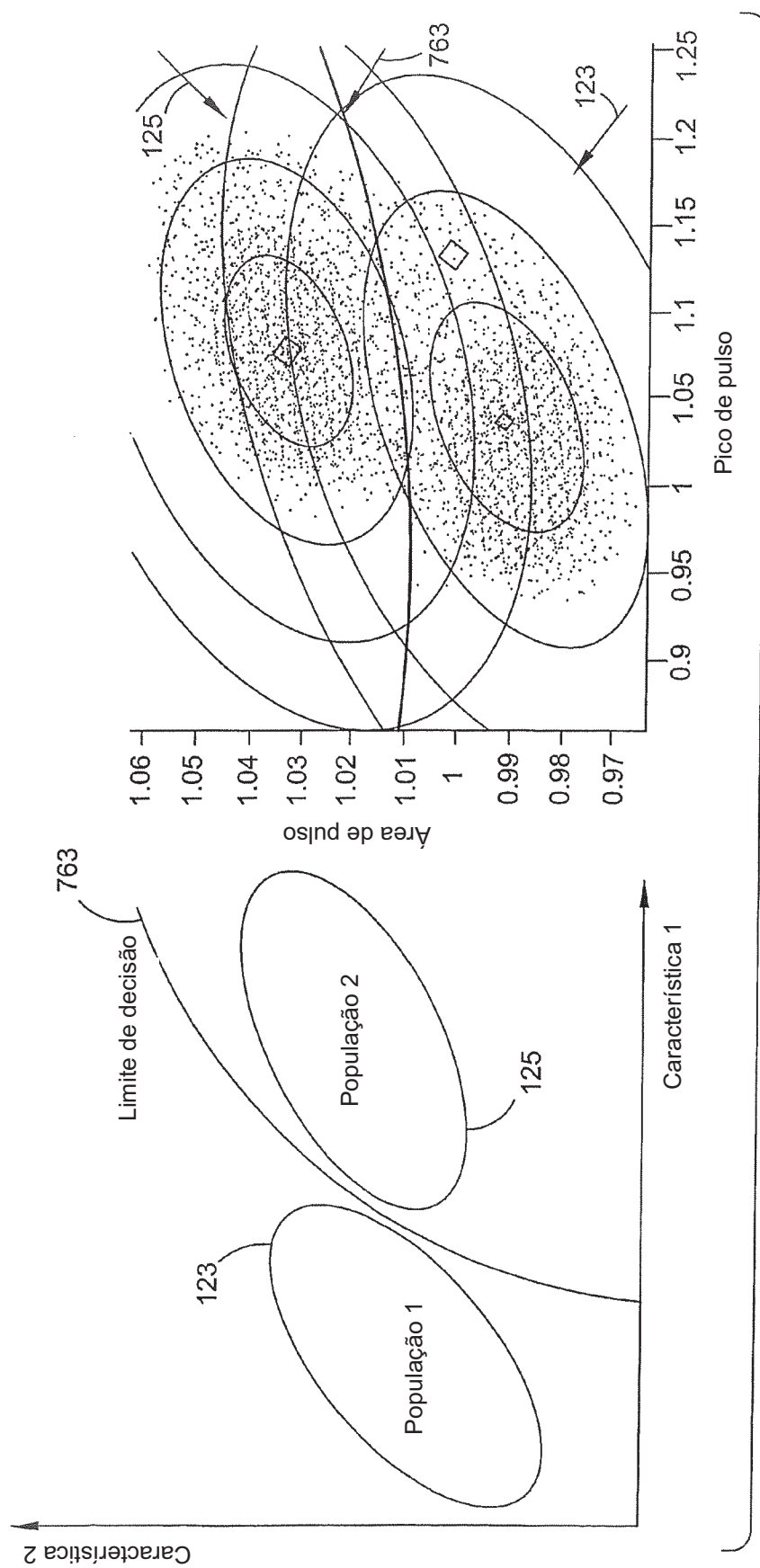


FIG. 74



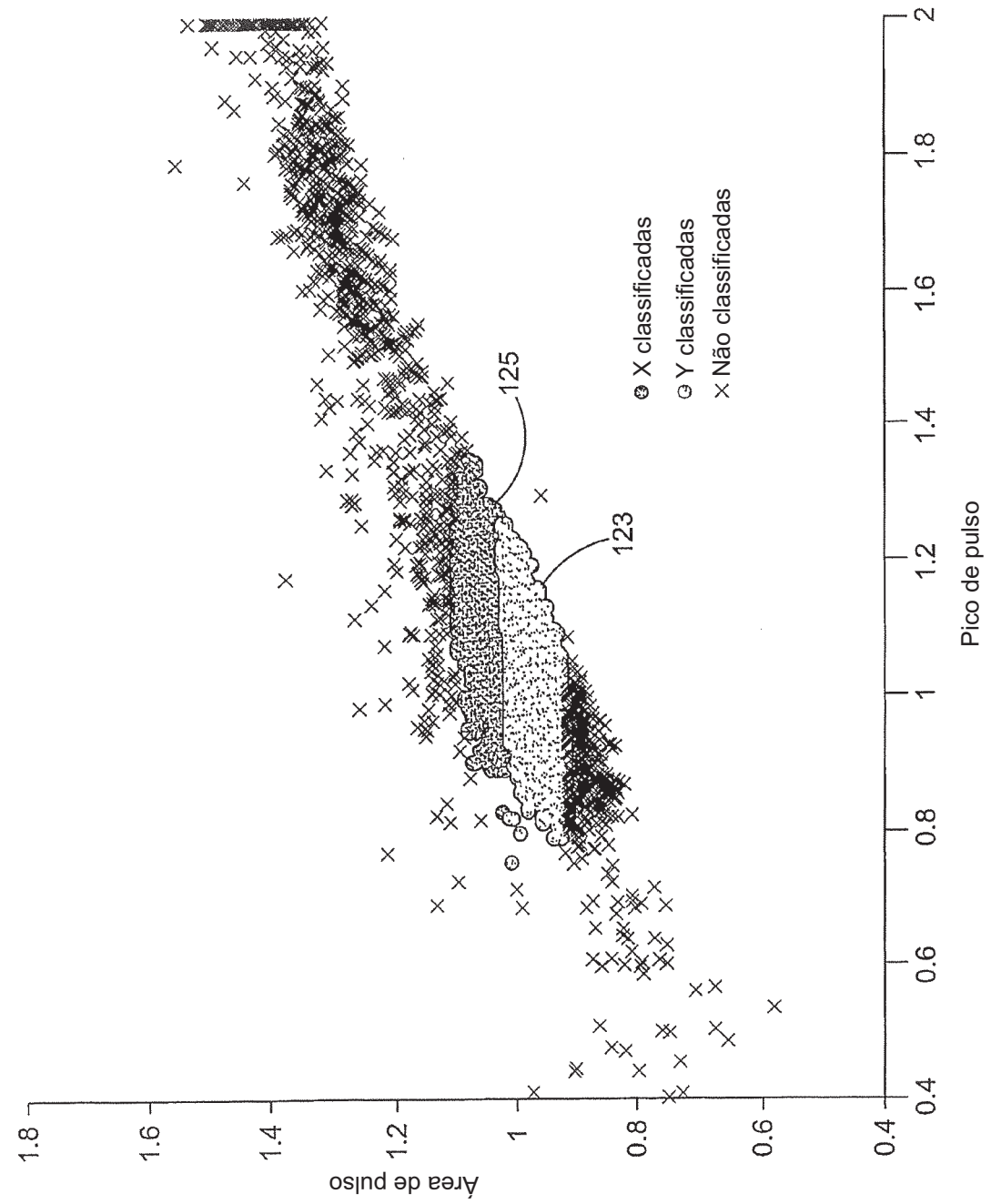
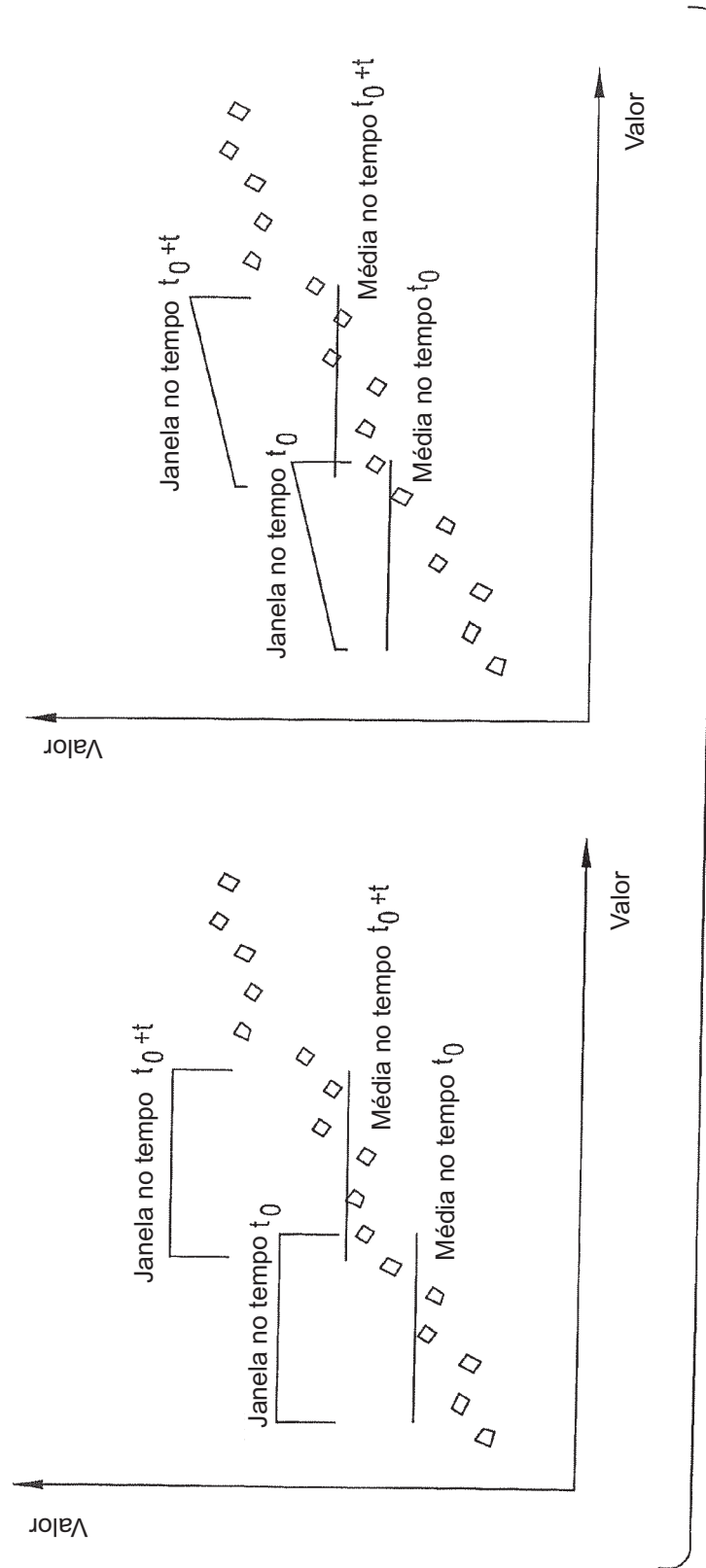


FIG. 76



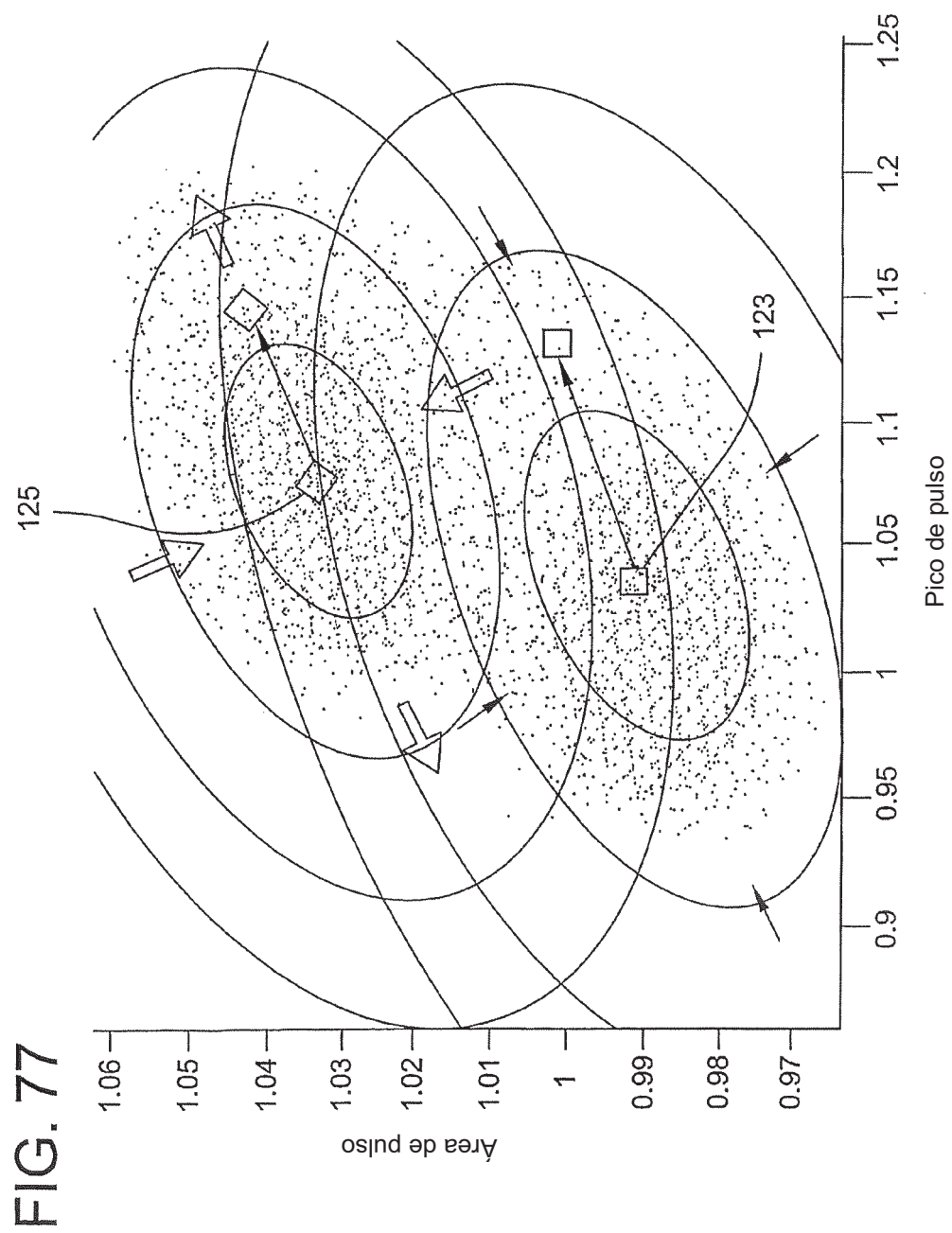


FIG. 78

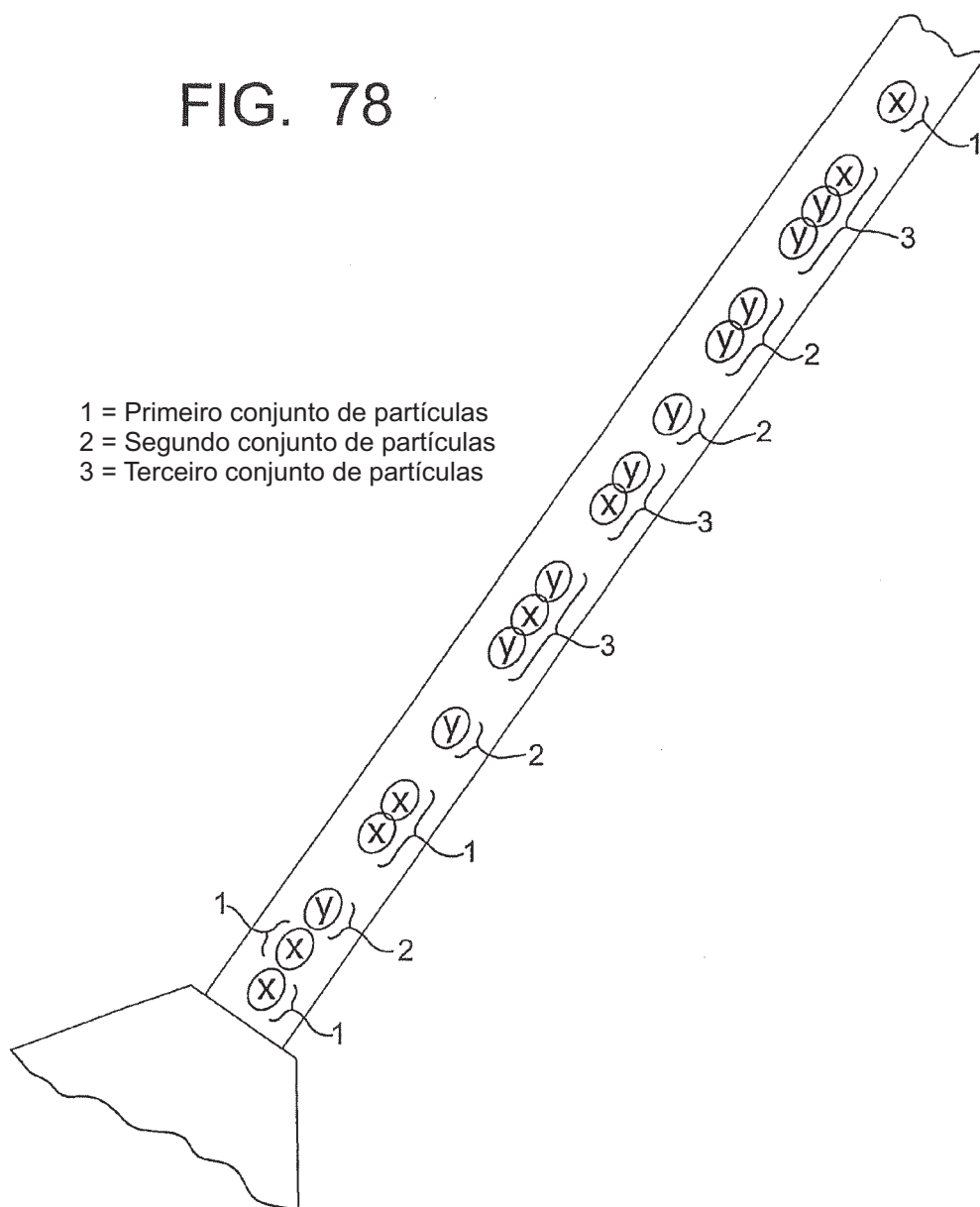


FIG. 79

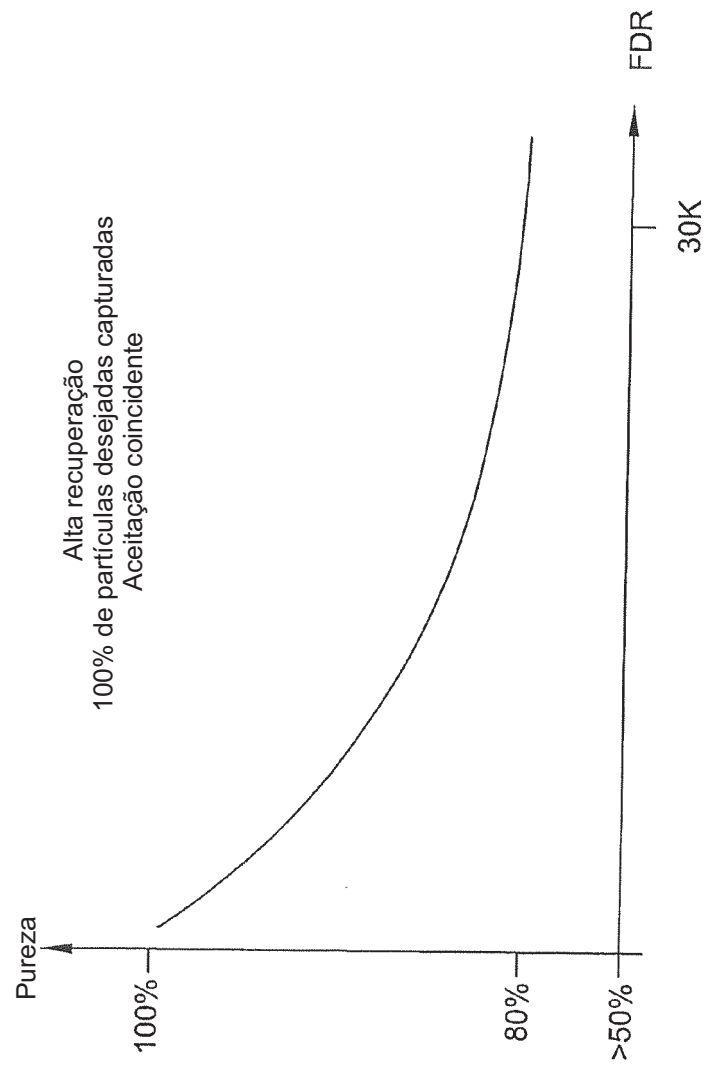


FIG. 80

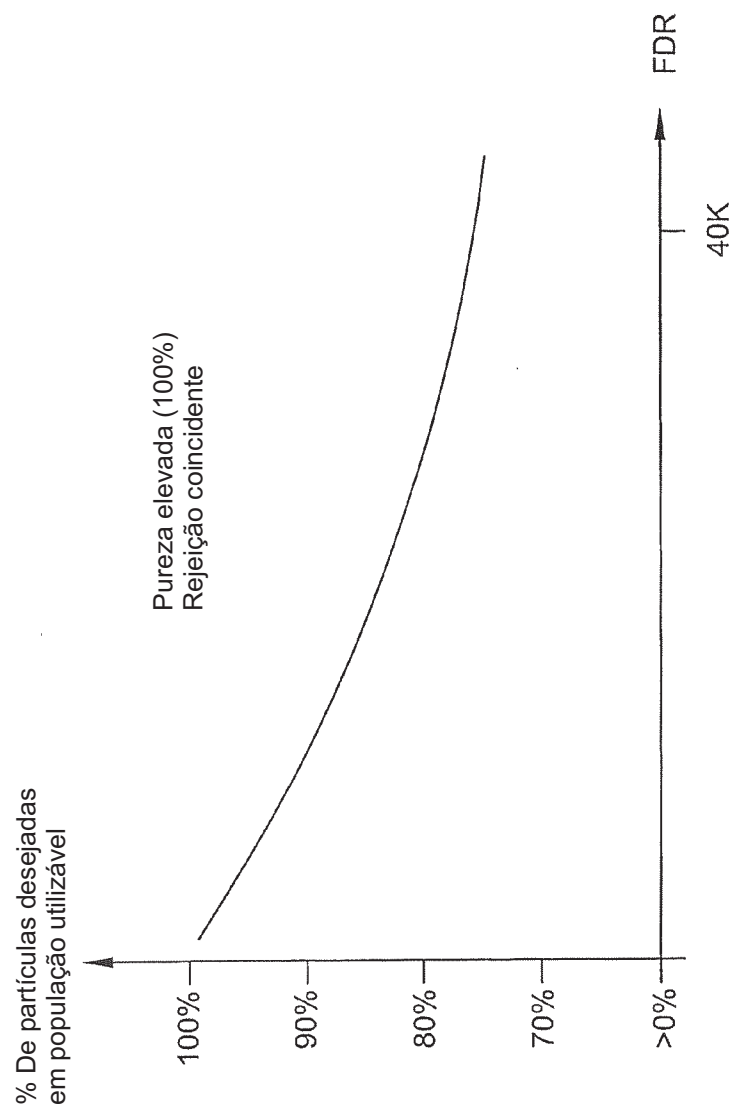
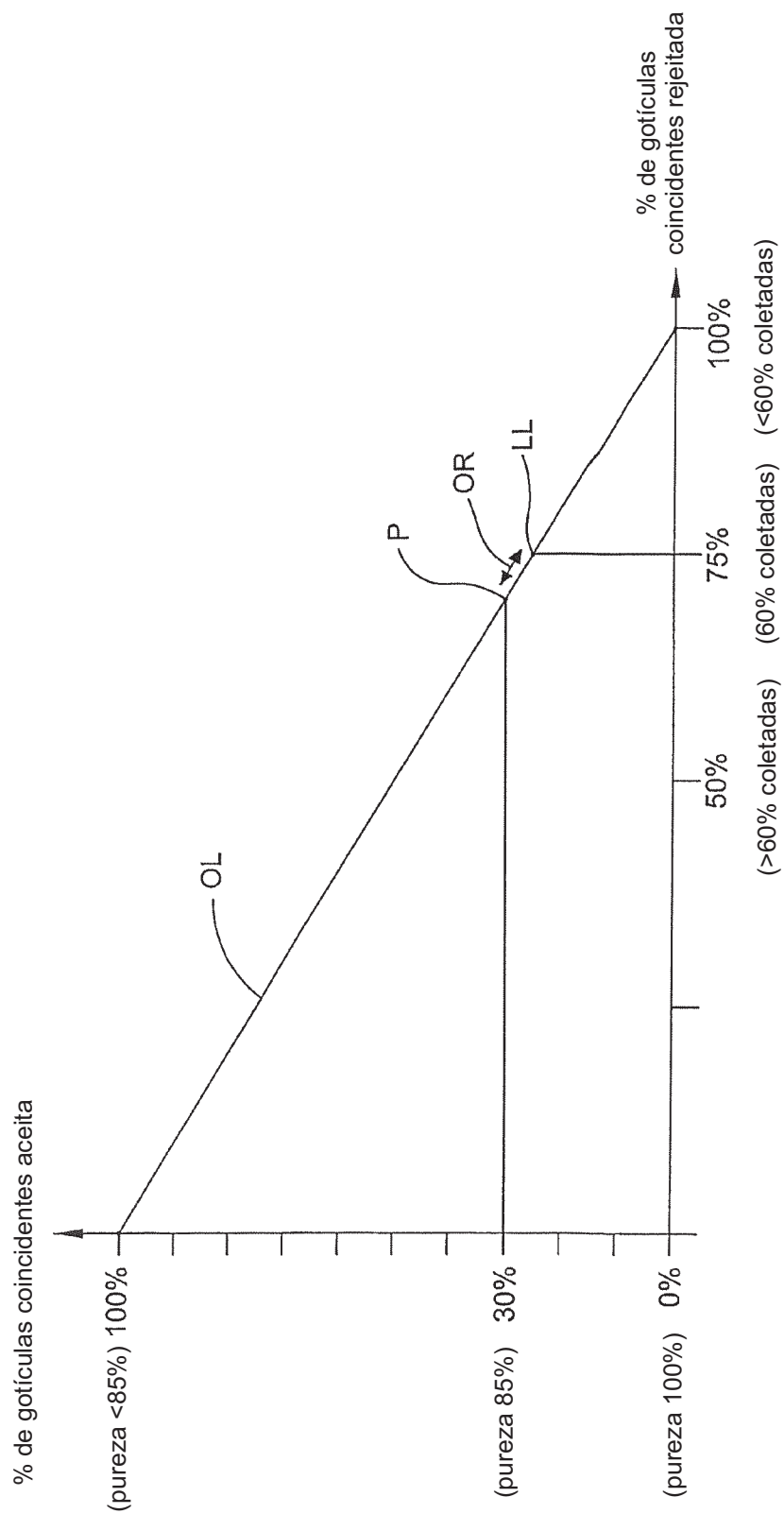


FIG. 81



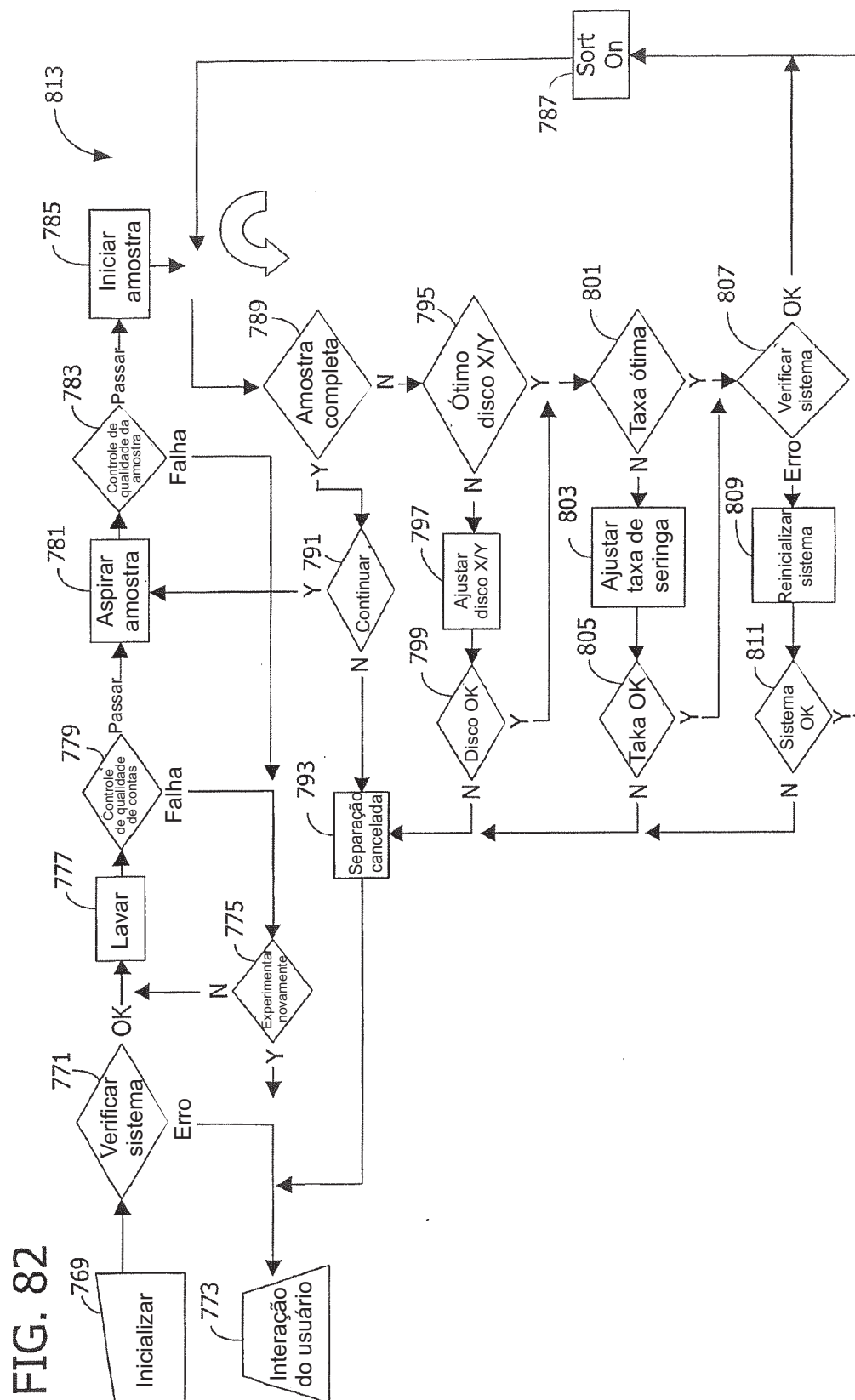
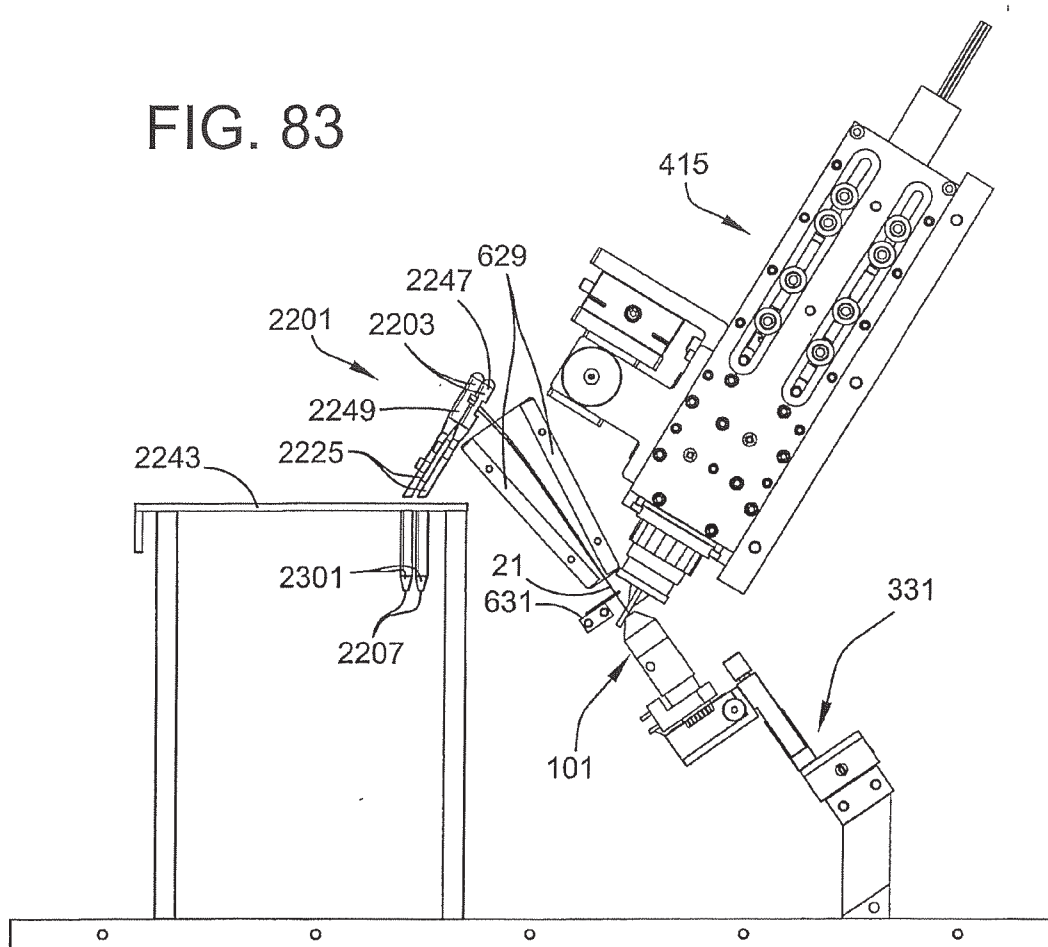


FIG. 83



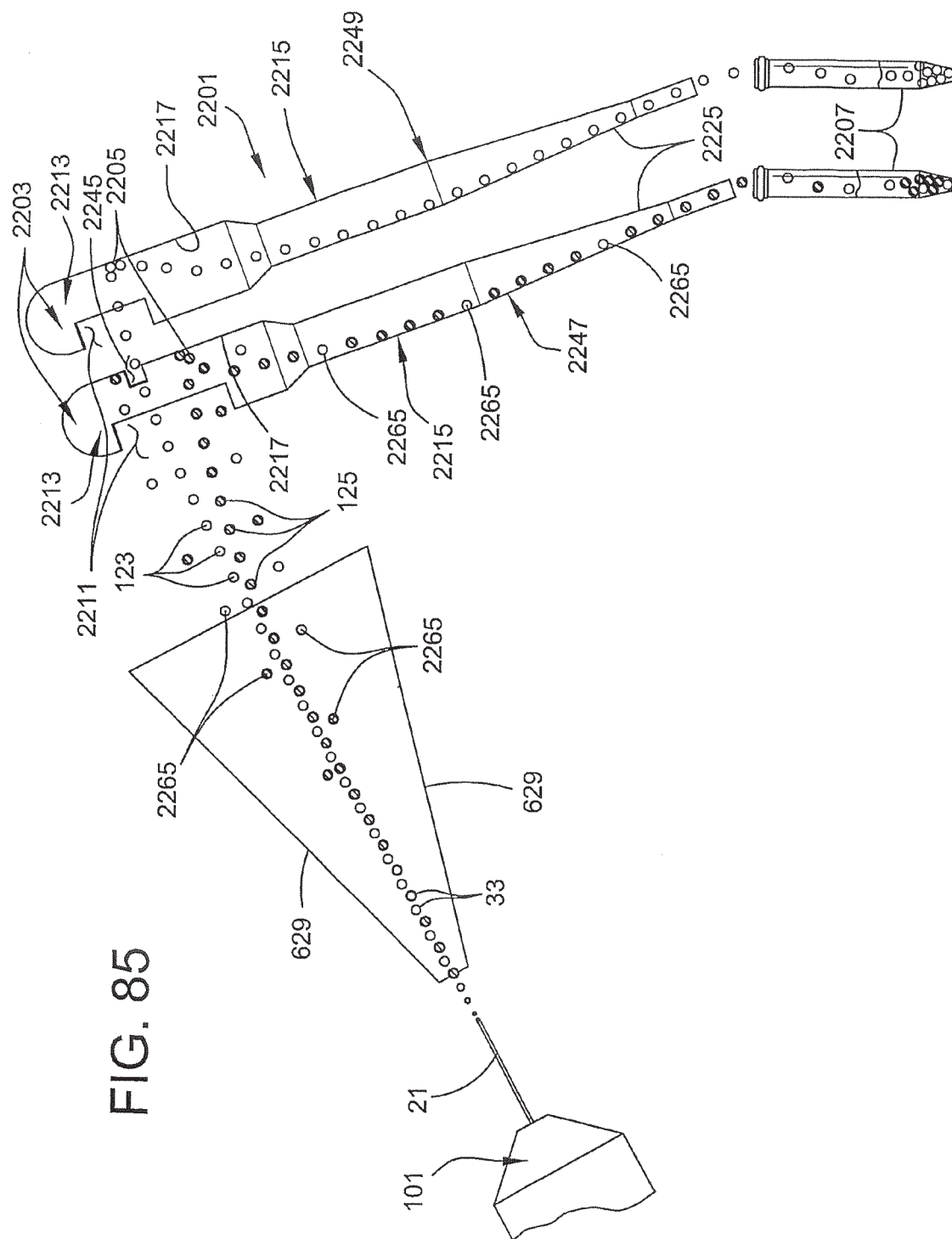


FIG. 85

FIG. 86

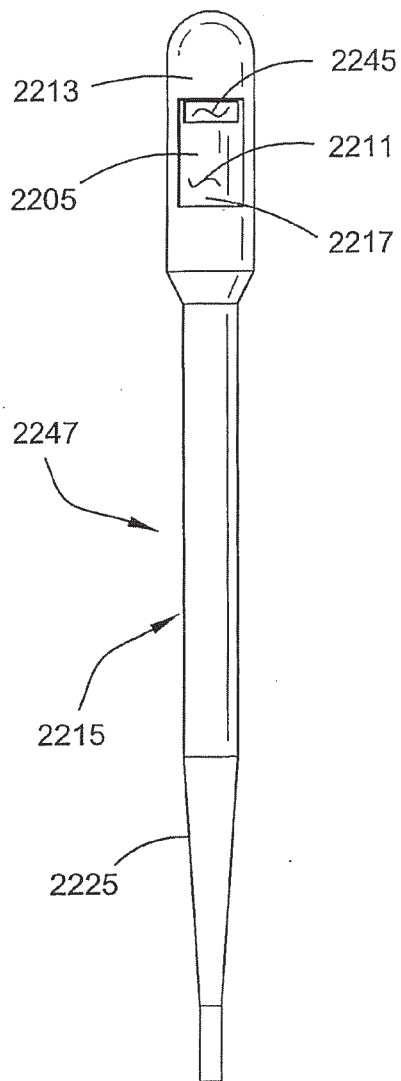


FIG. 87

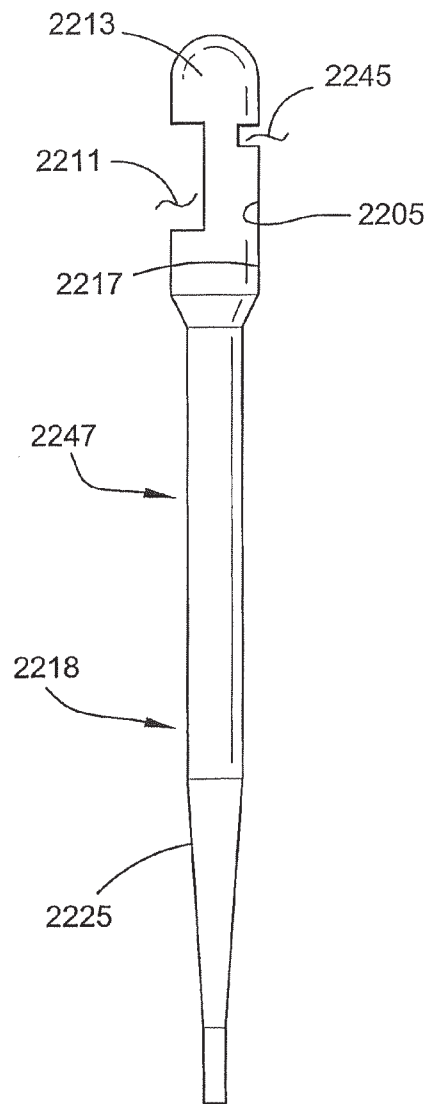


FIG. 88

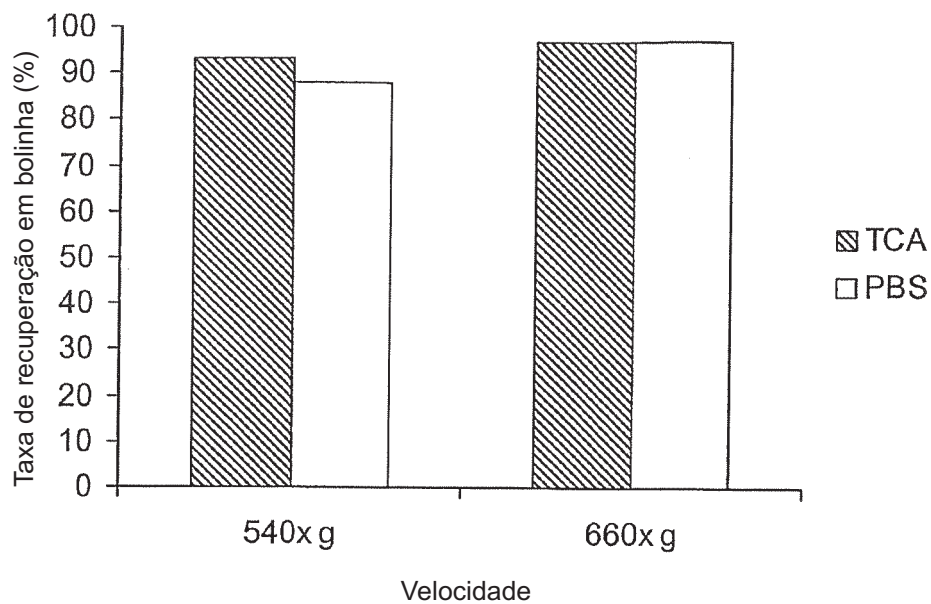


FIG. 89

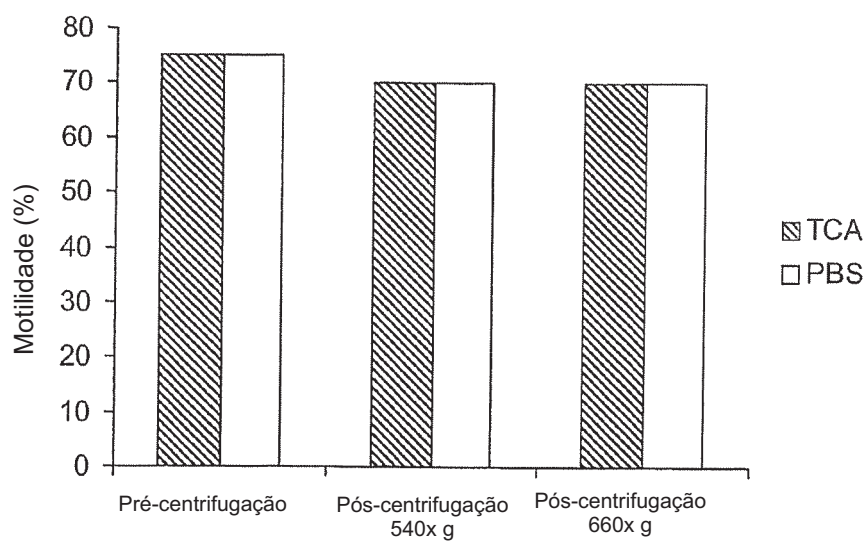


FIG. 90

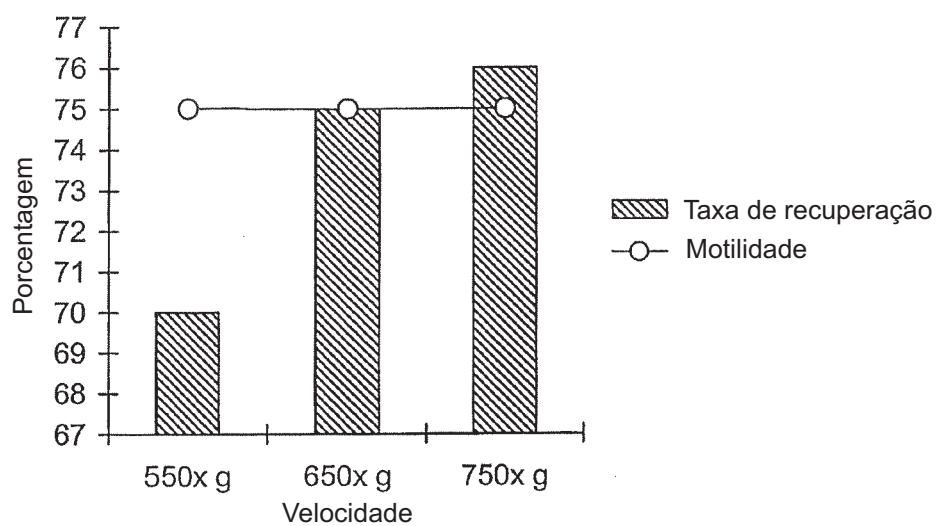


FIG. 91

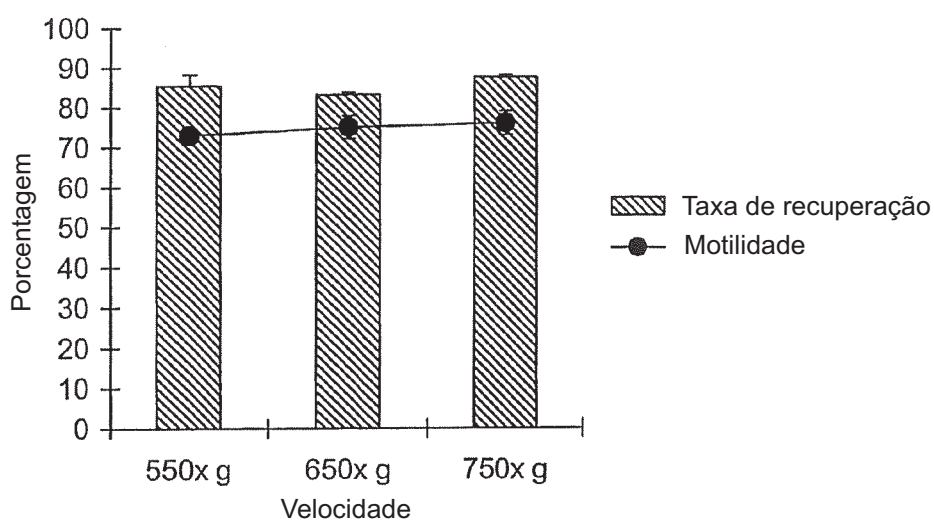


FIG. 92

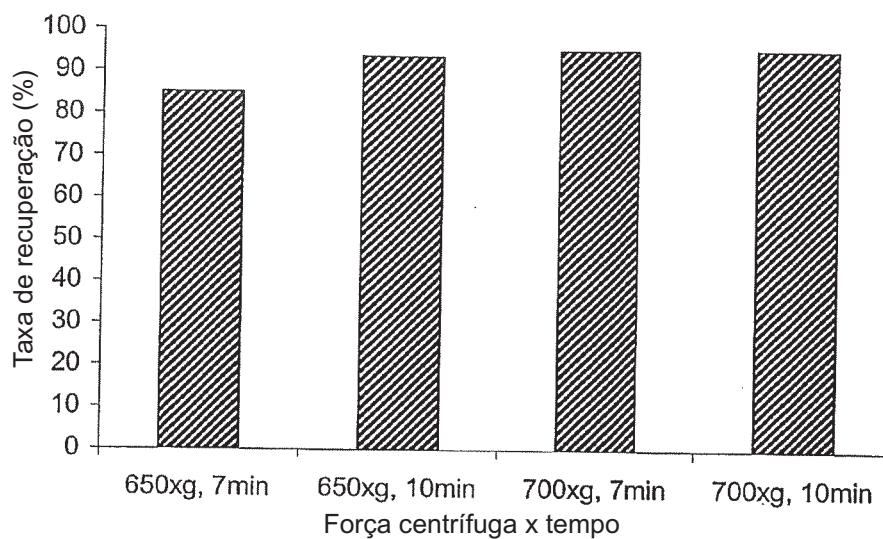


FIG. 93

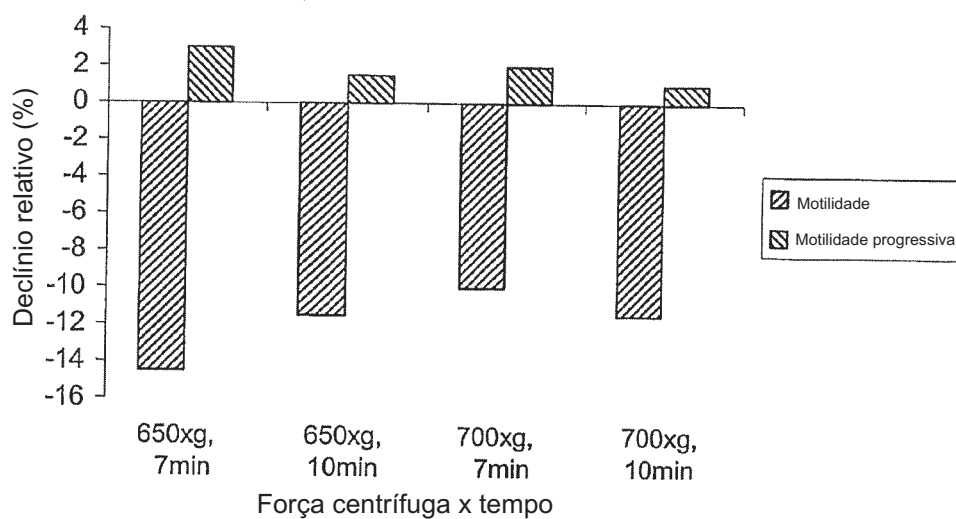


FIG. 94

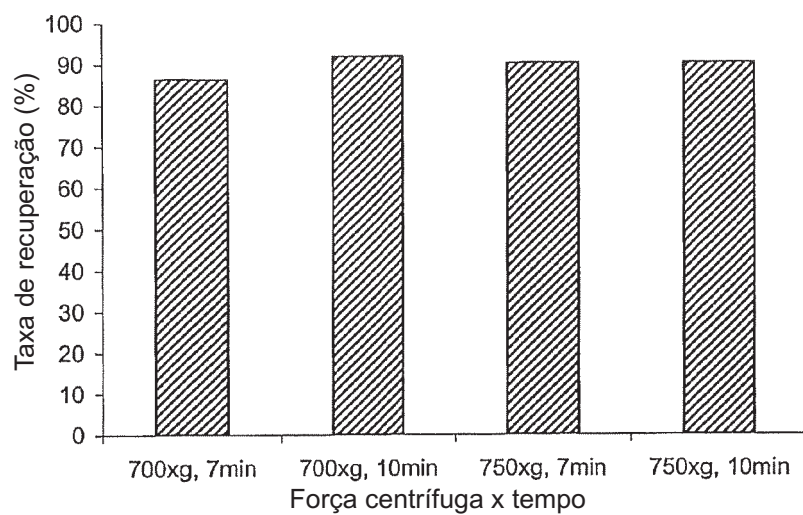
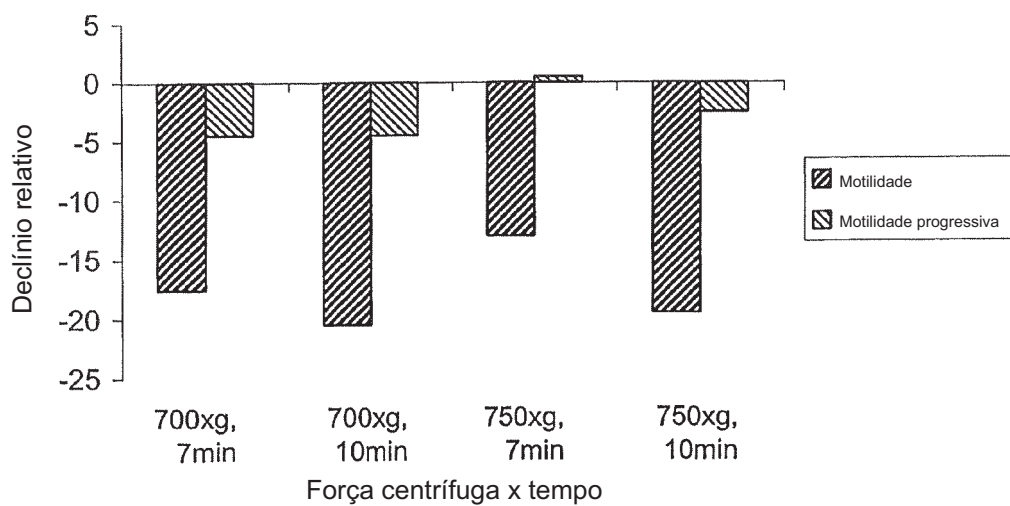


FIG. 95



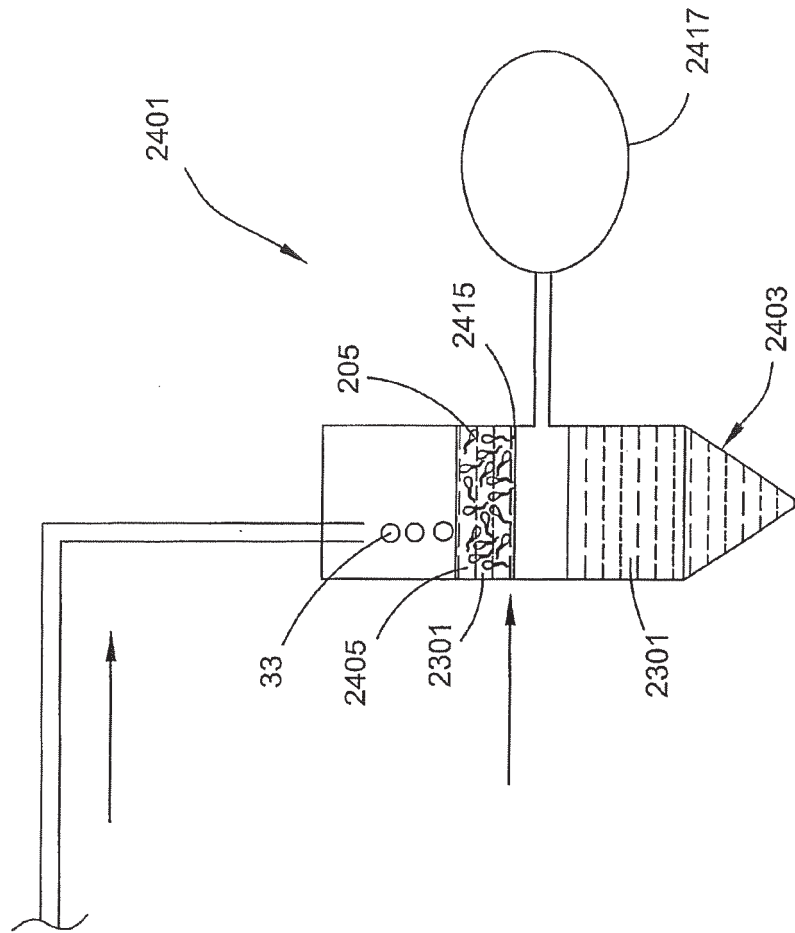
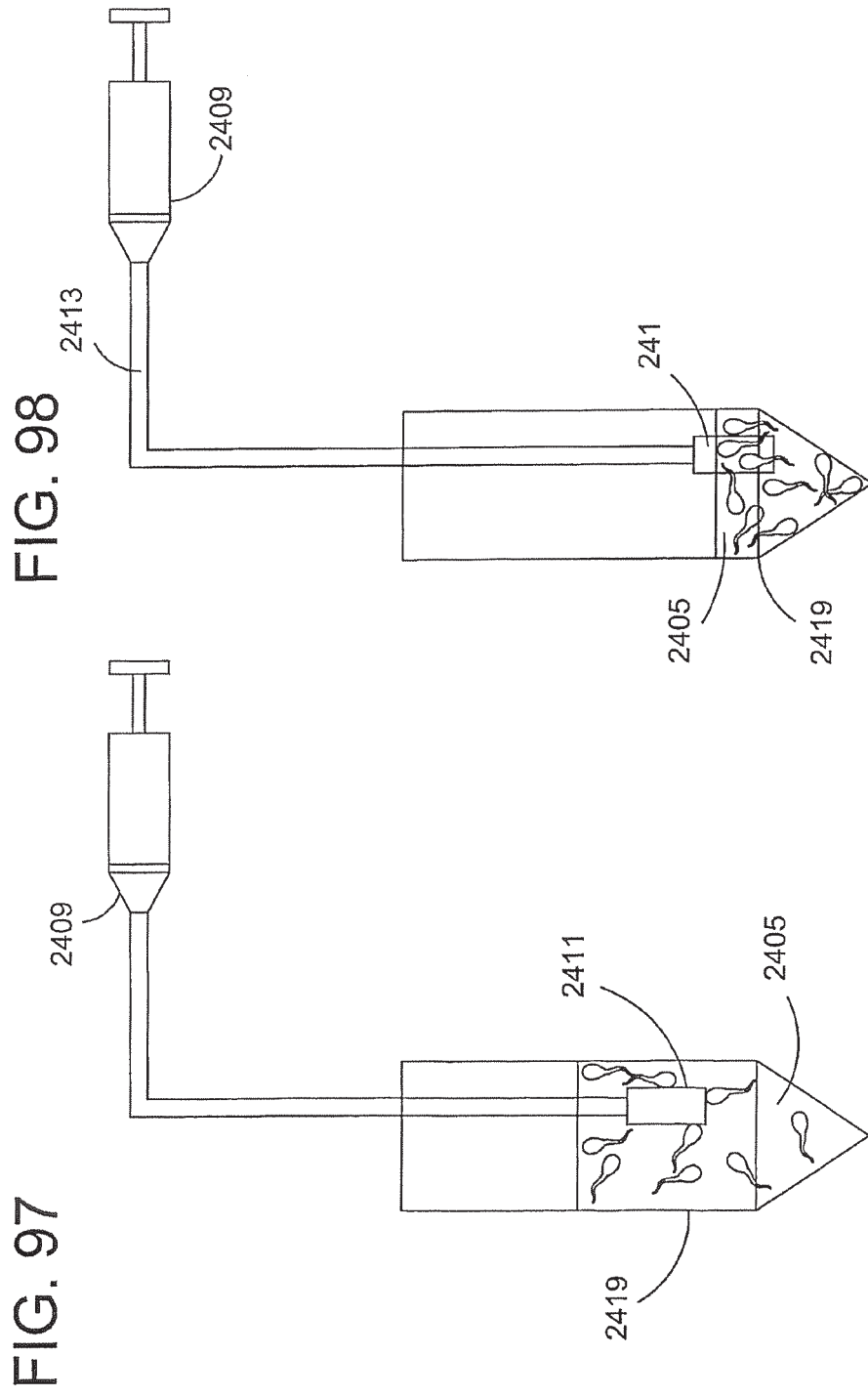
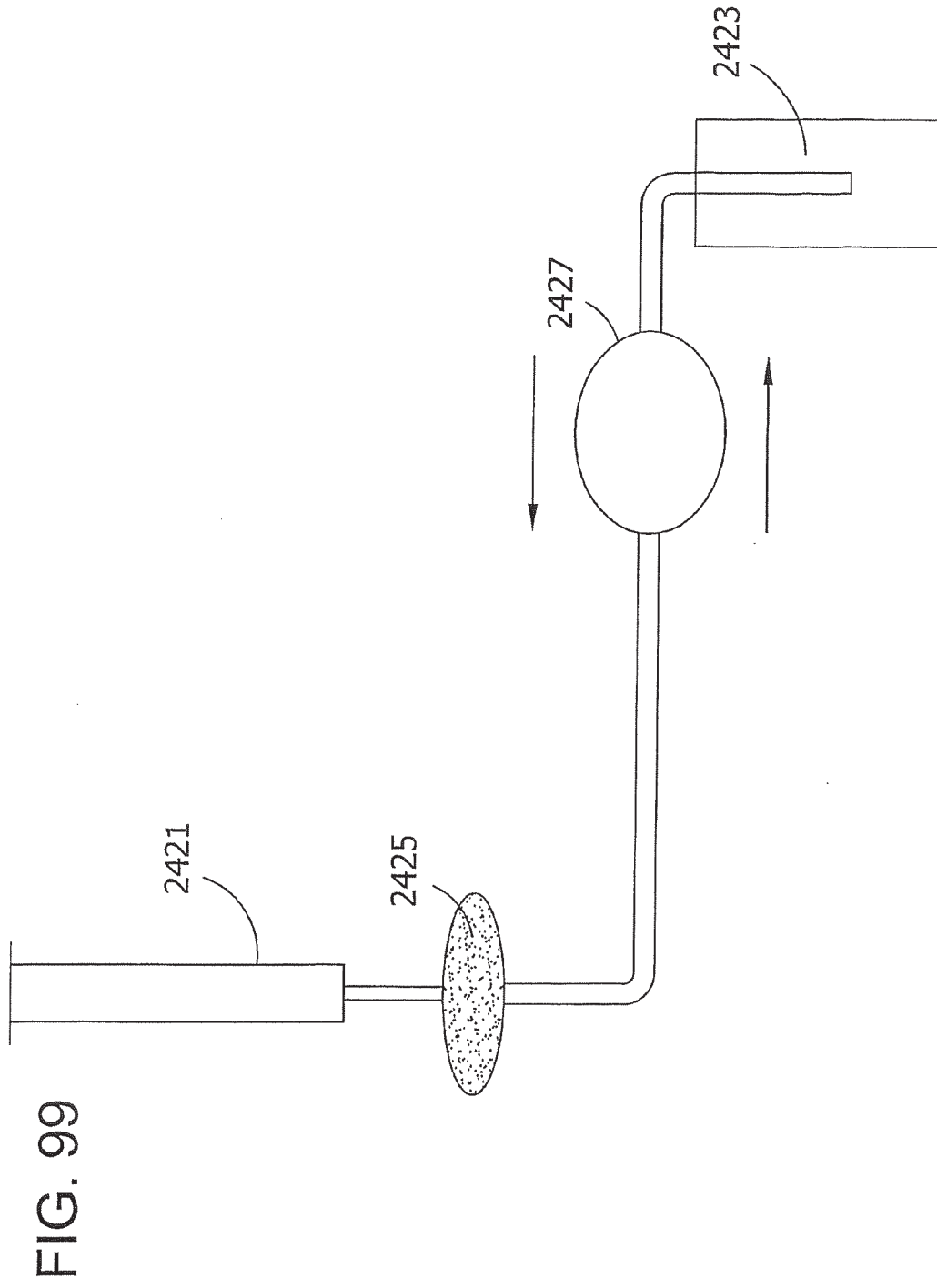


FIG. 96





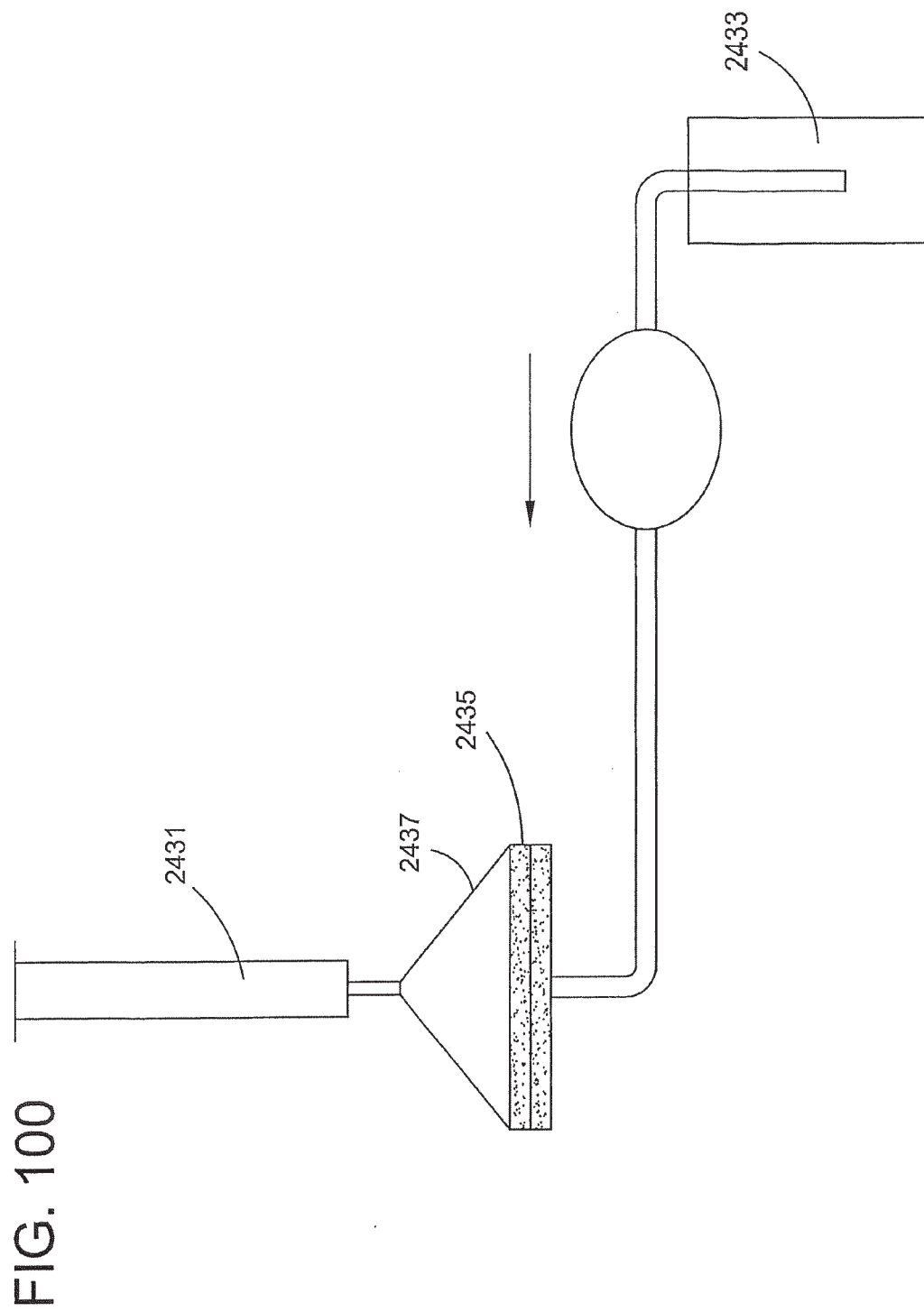


FIG. 101

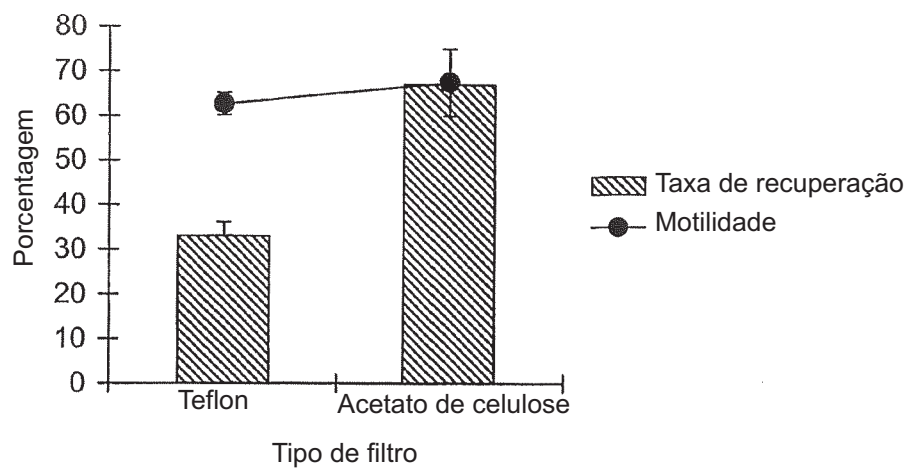


FIG. 102

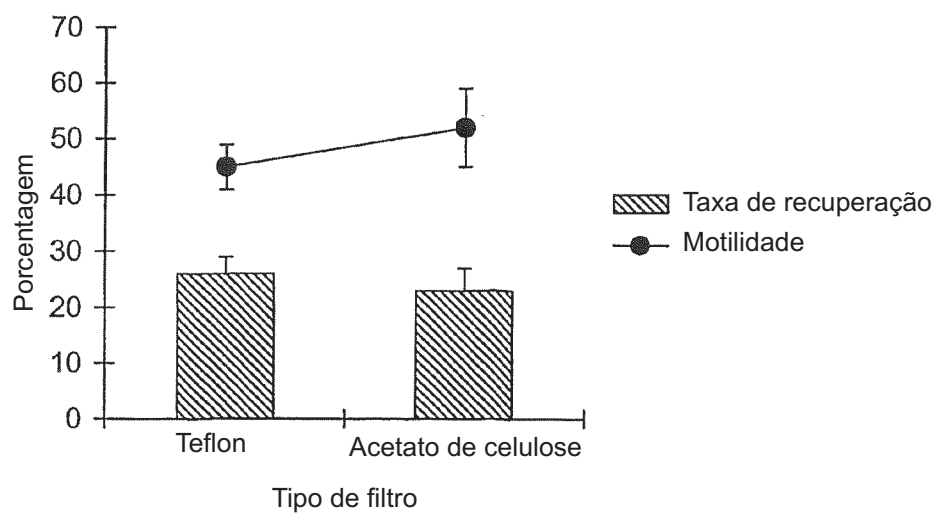


FIG. 103

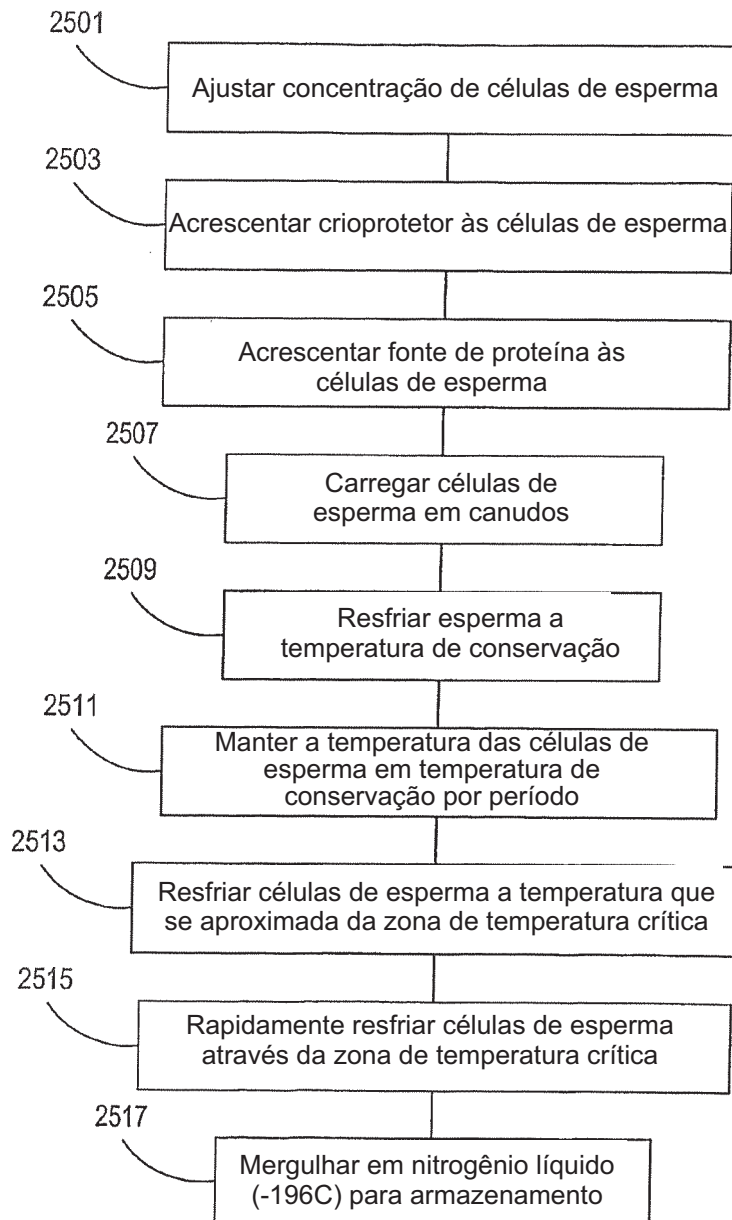


FIG. 104

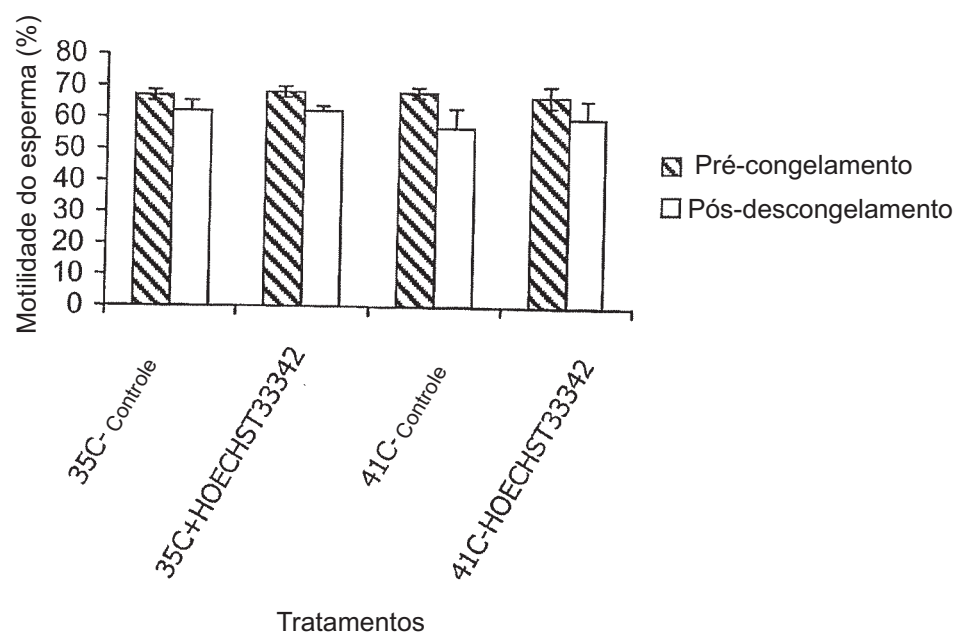
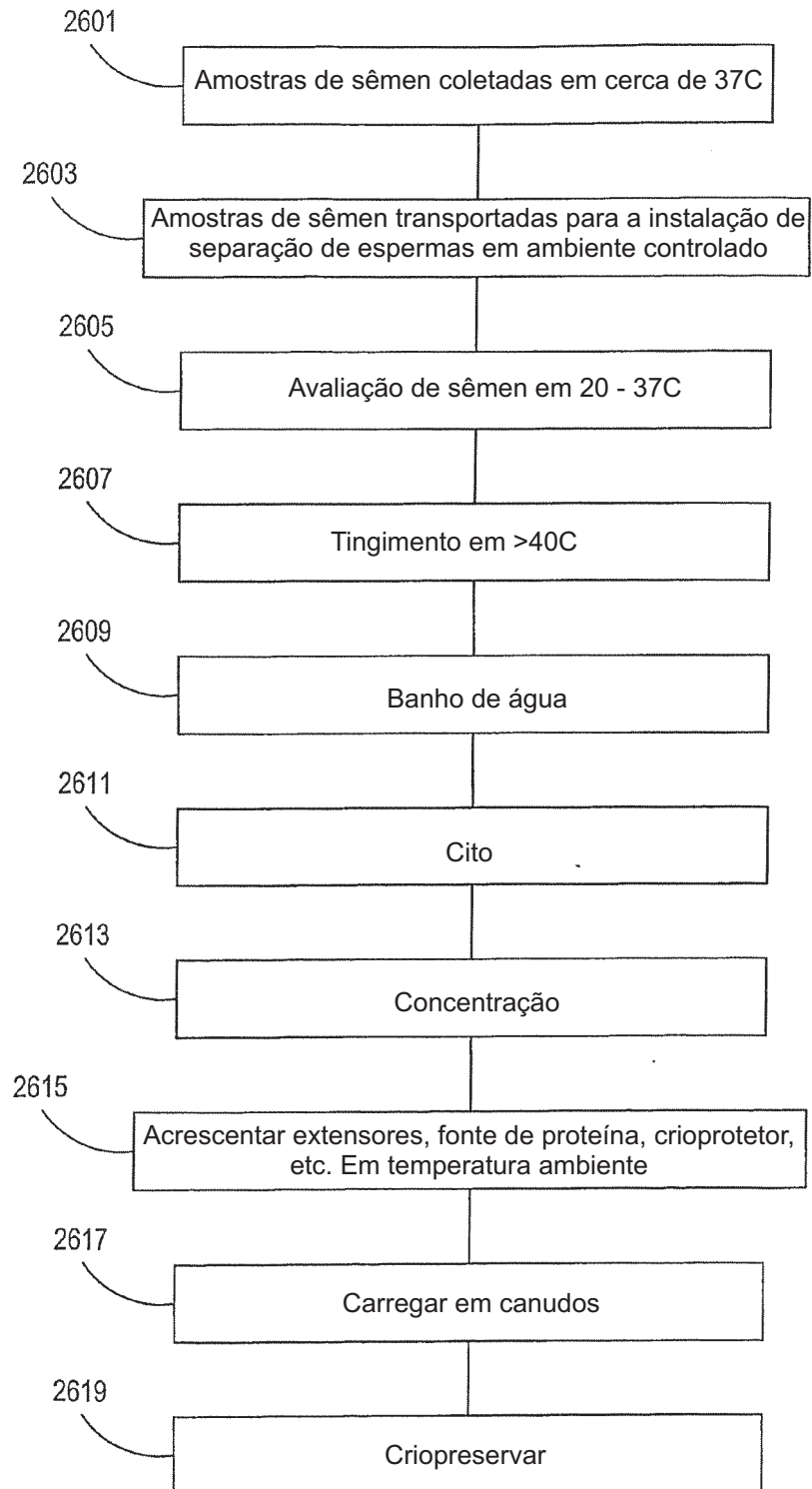


FIG. 105



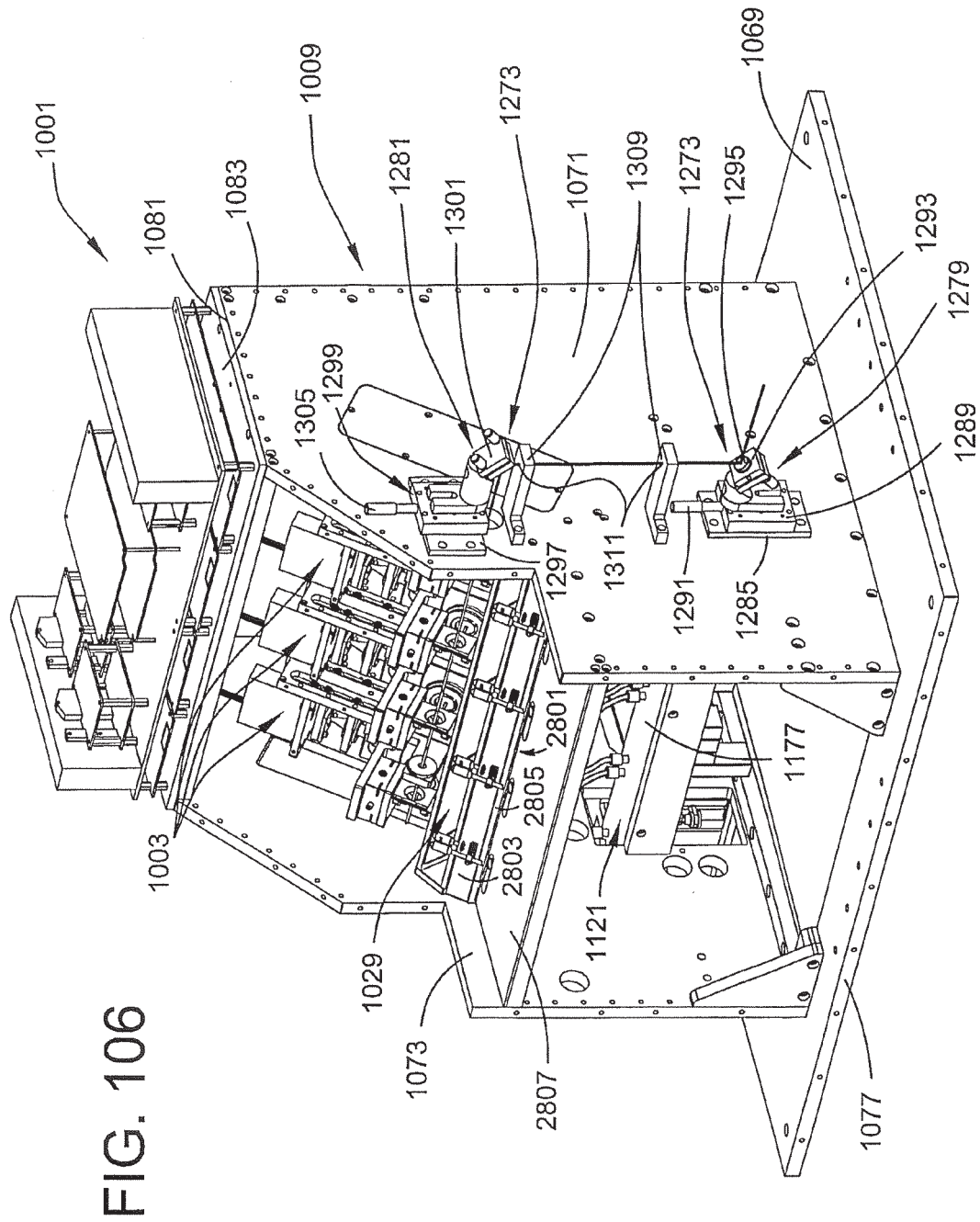
106
EIG[®]

FIG. 107

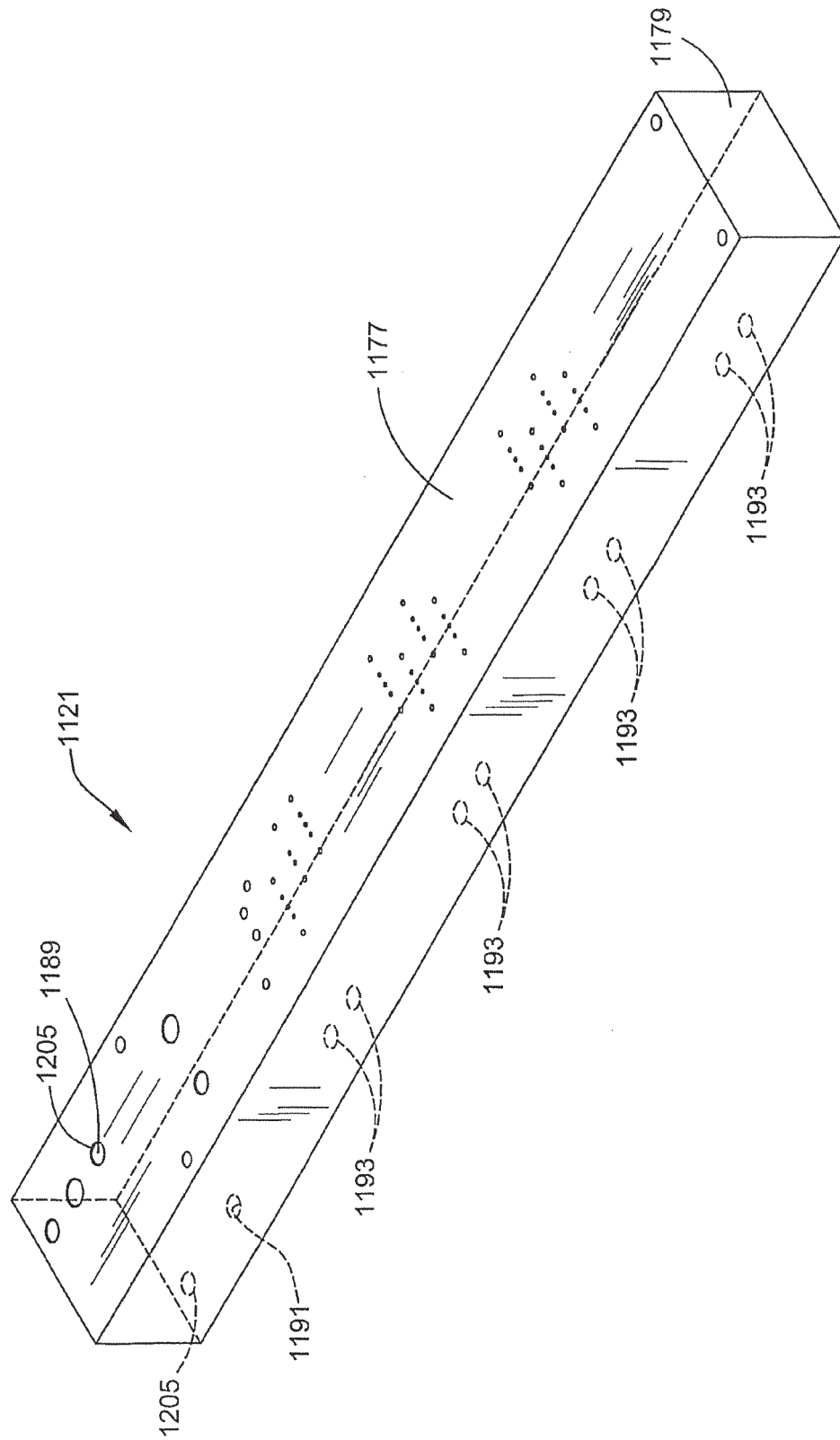
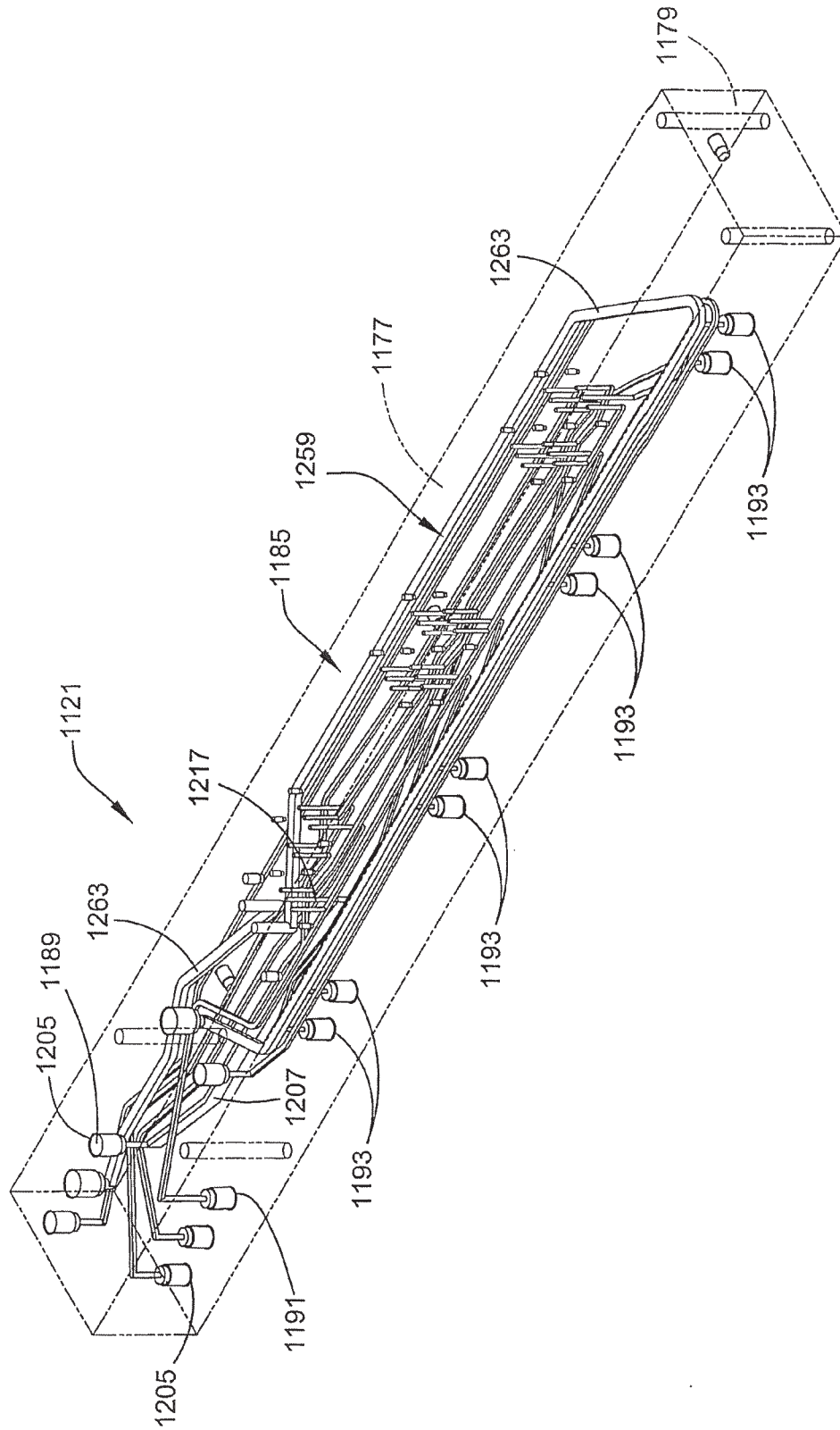


FIG. 108



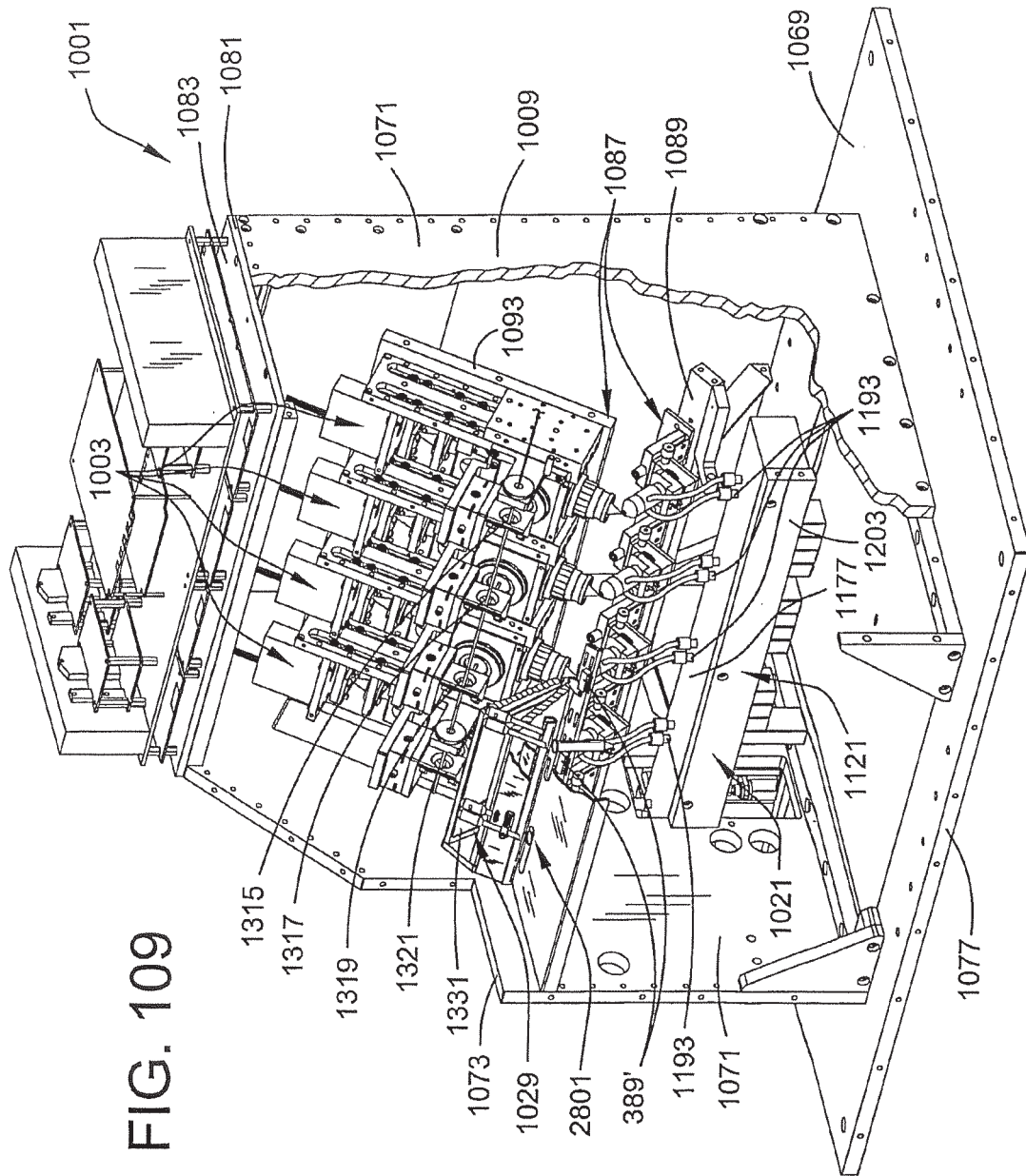


FIG. 109

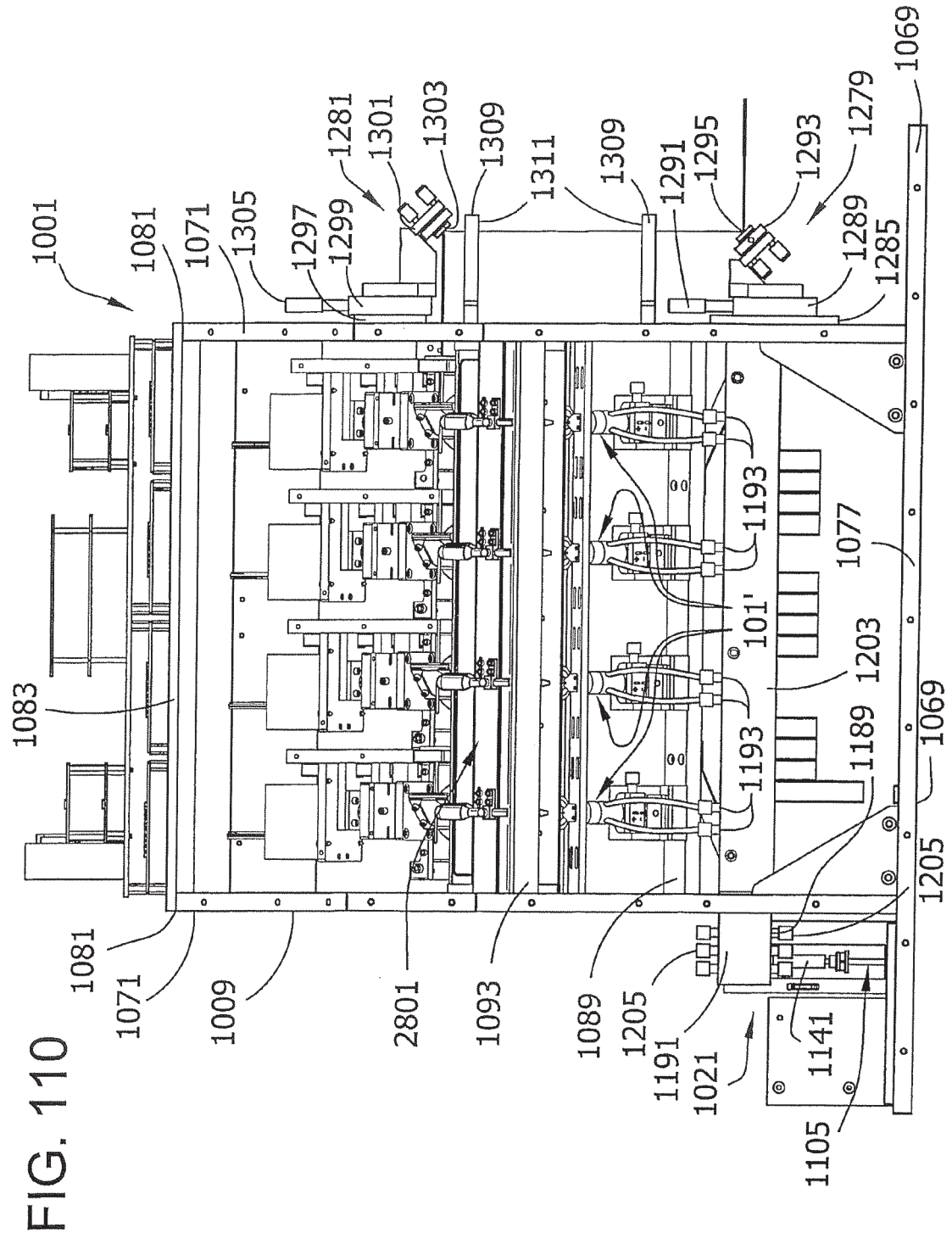


FIG. 111

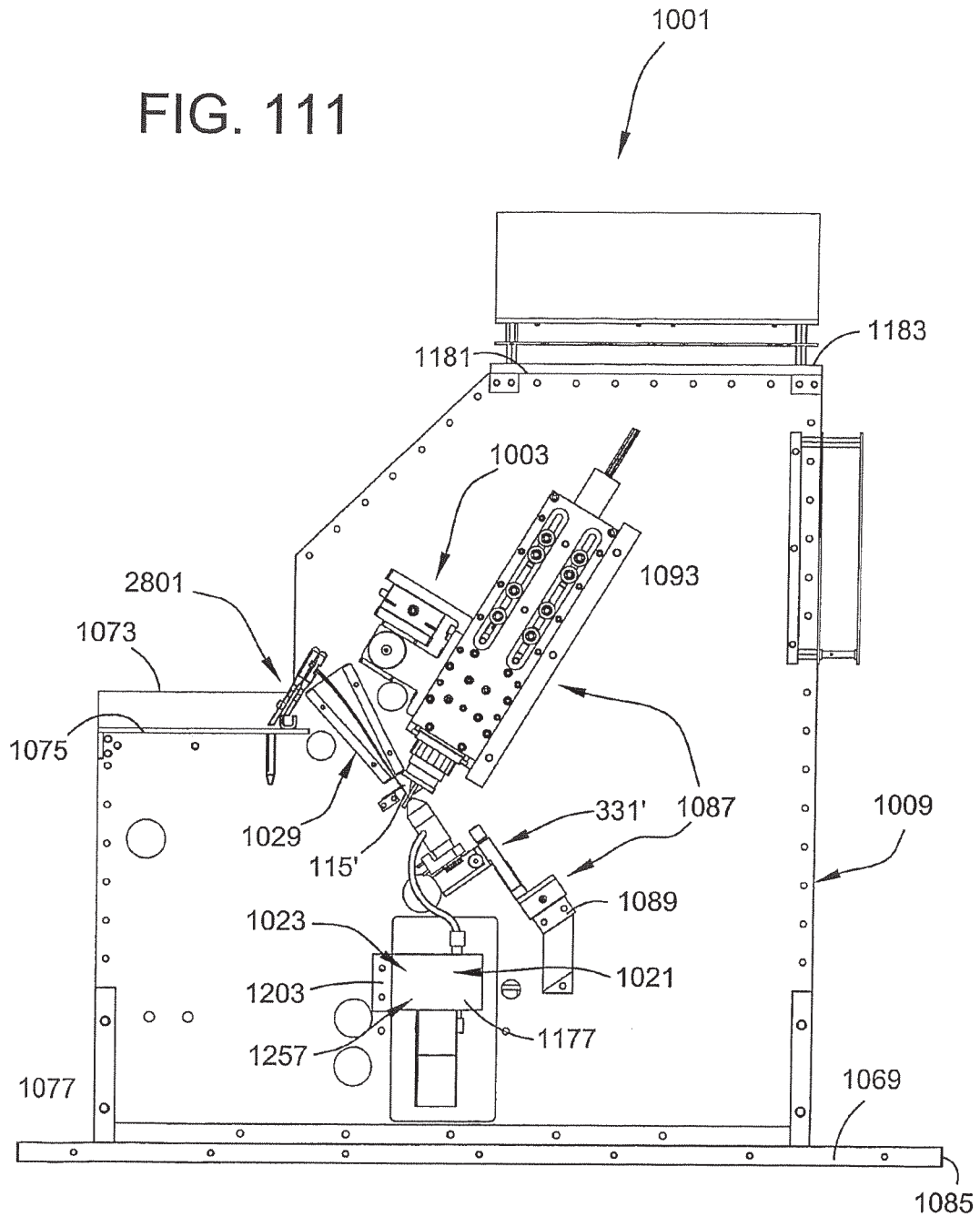
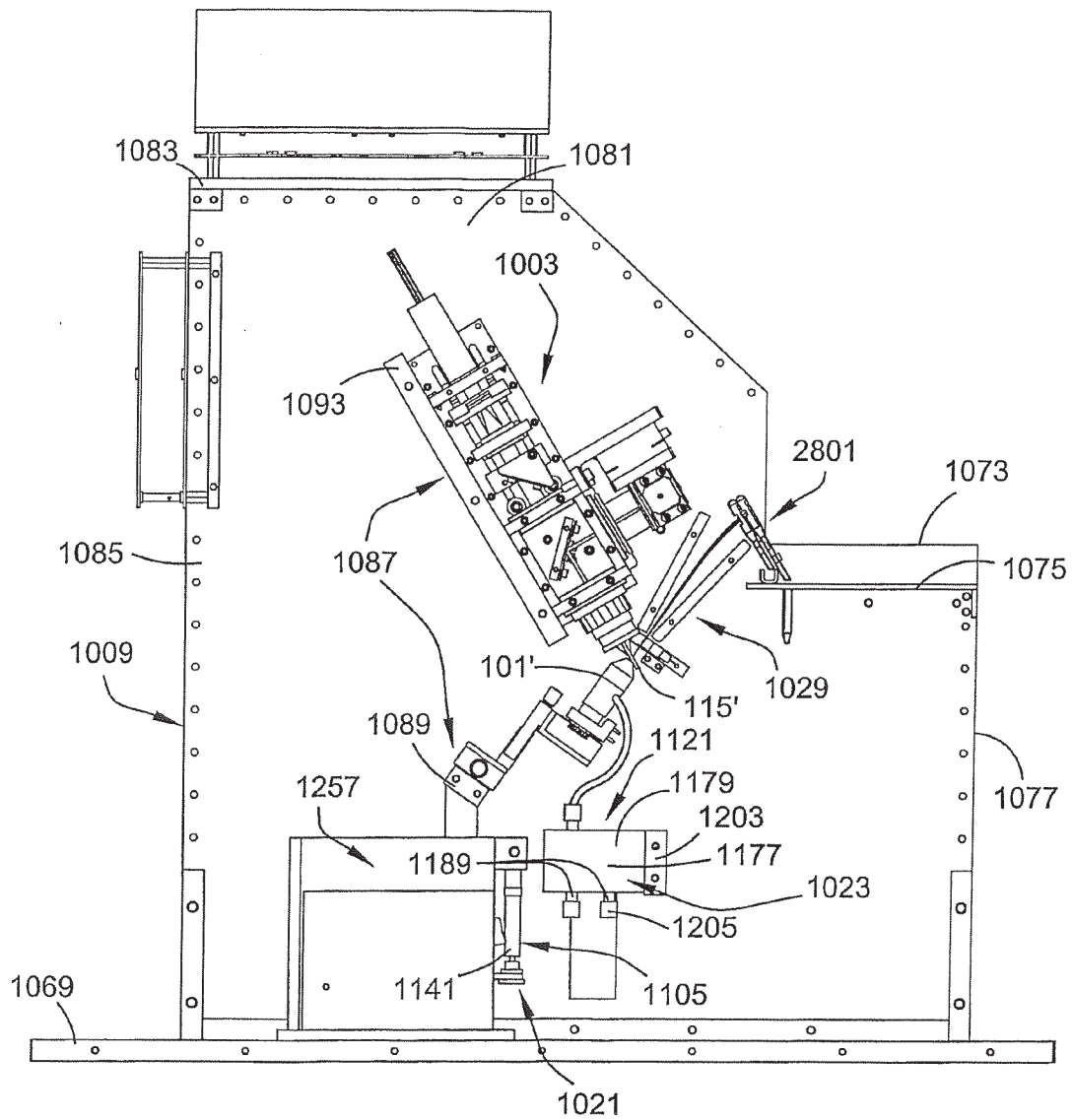
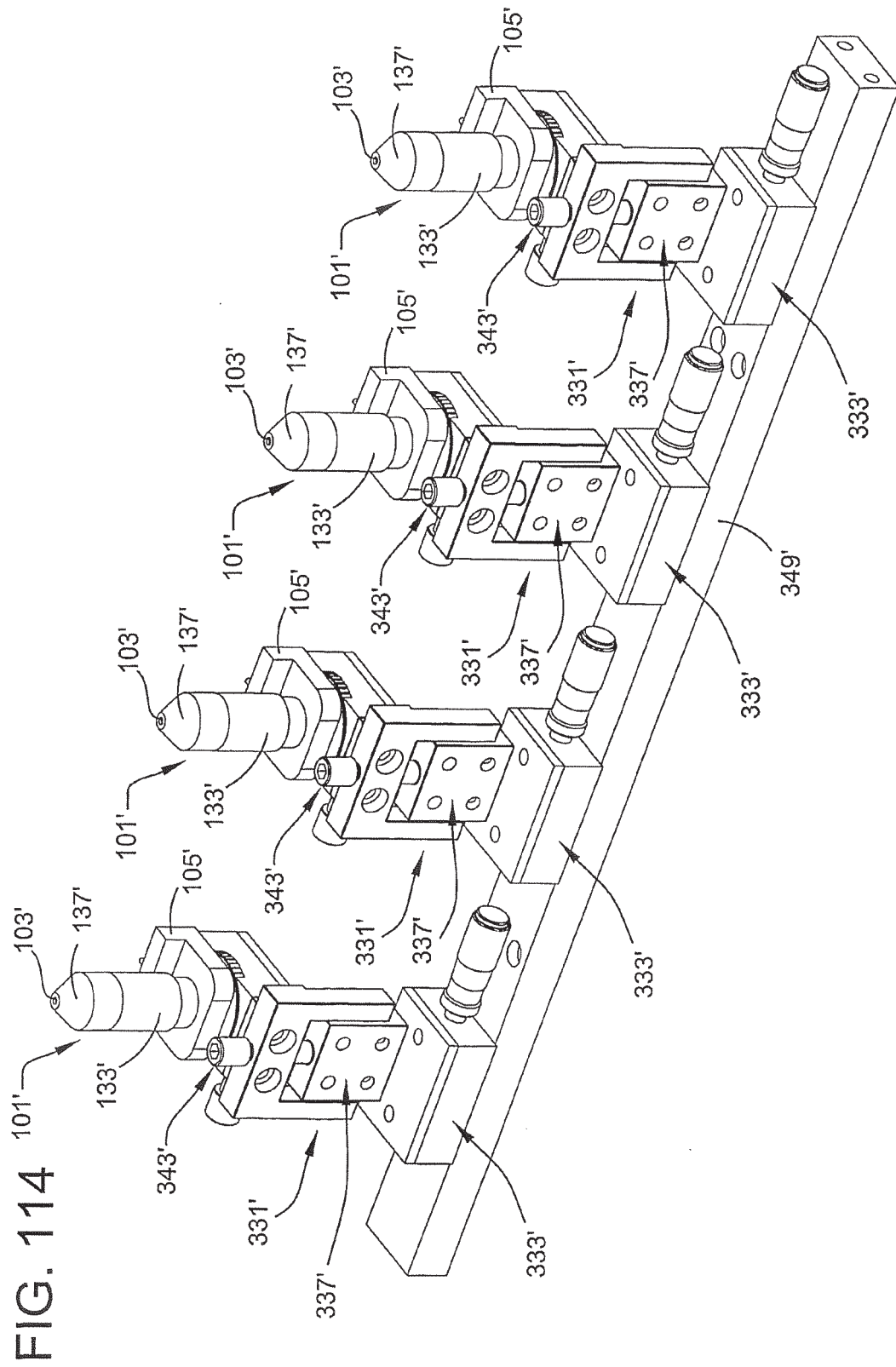


FIG. 112







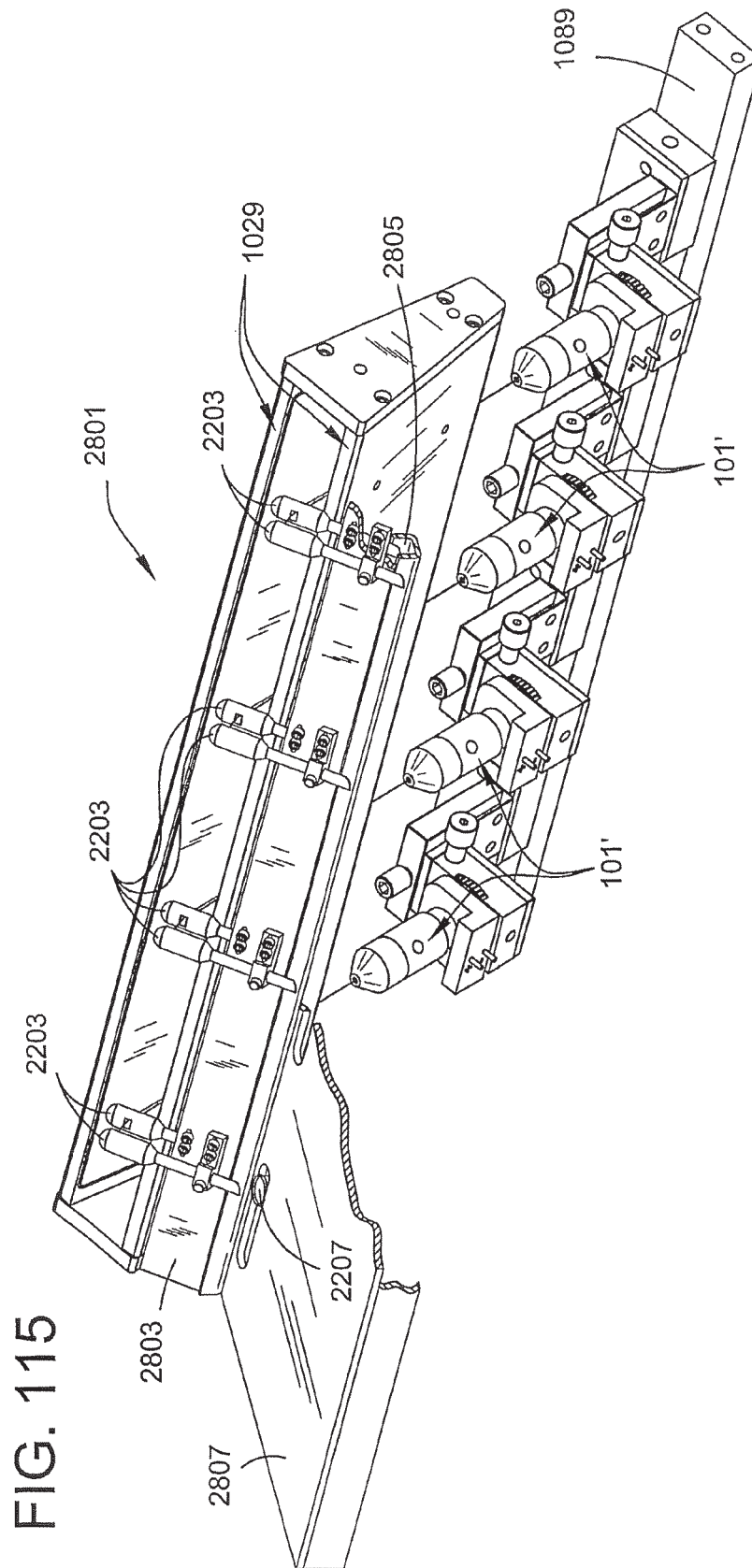


FIG. 115

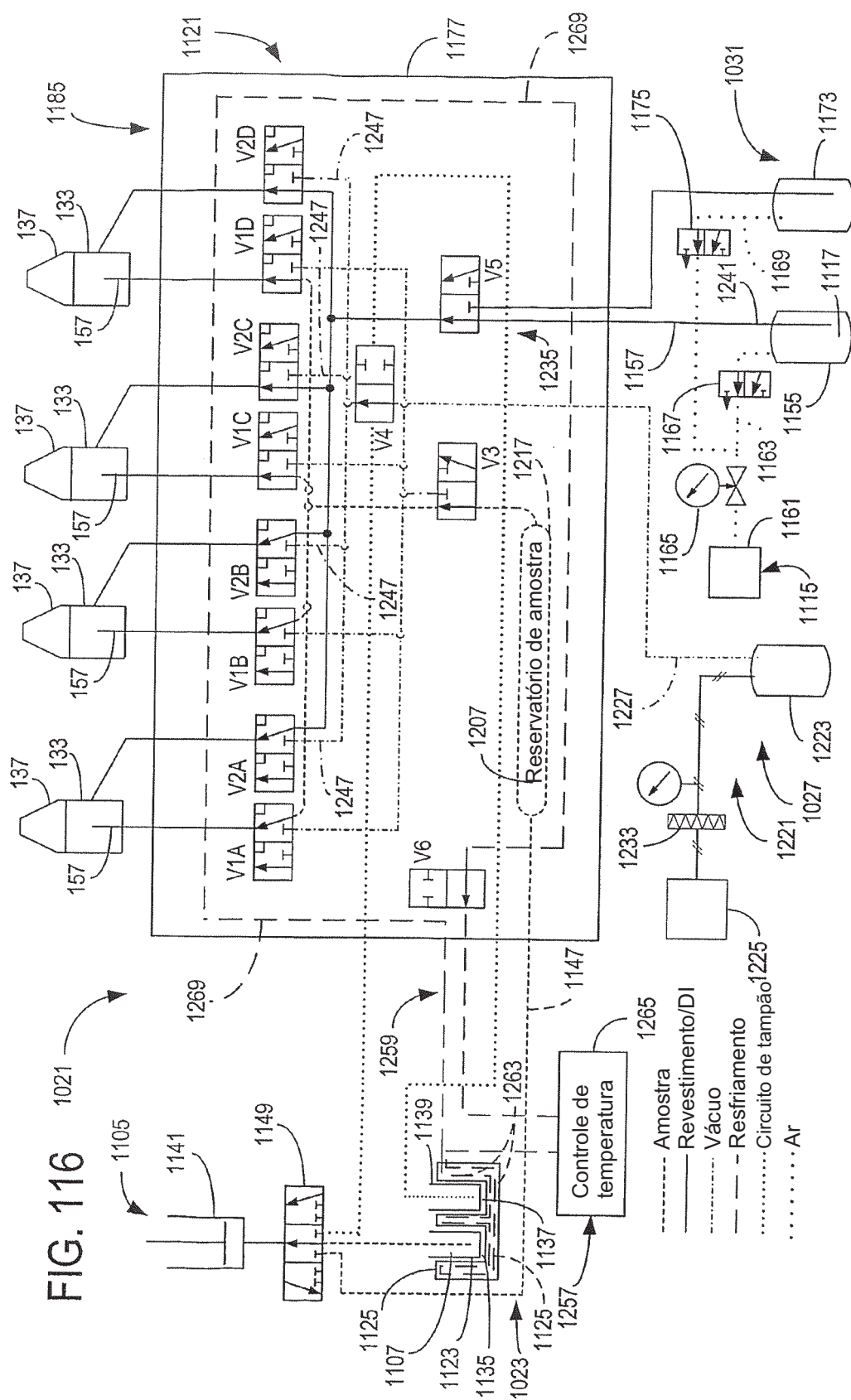


FIG. 117

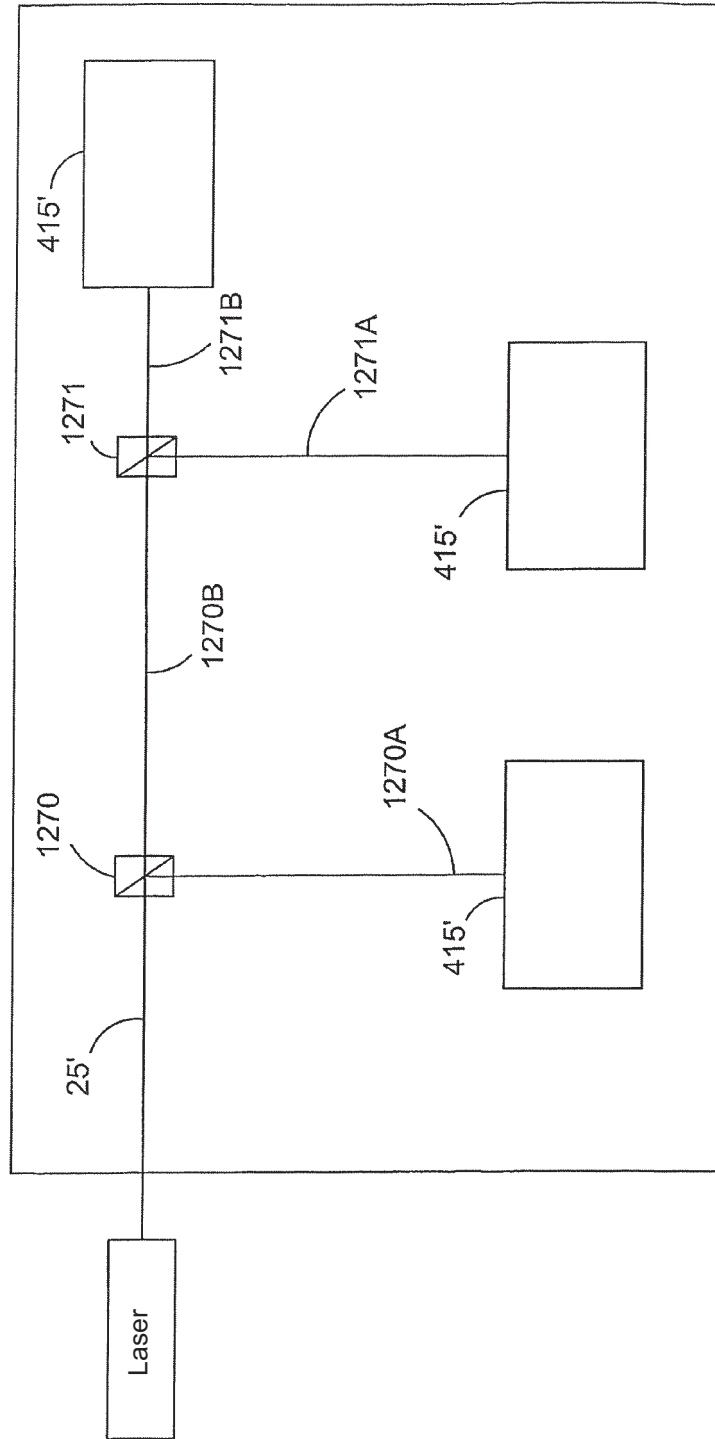
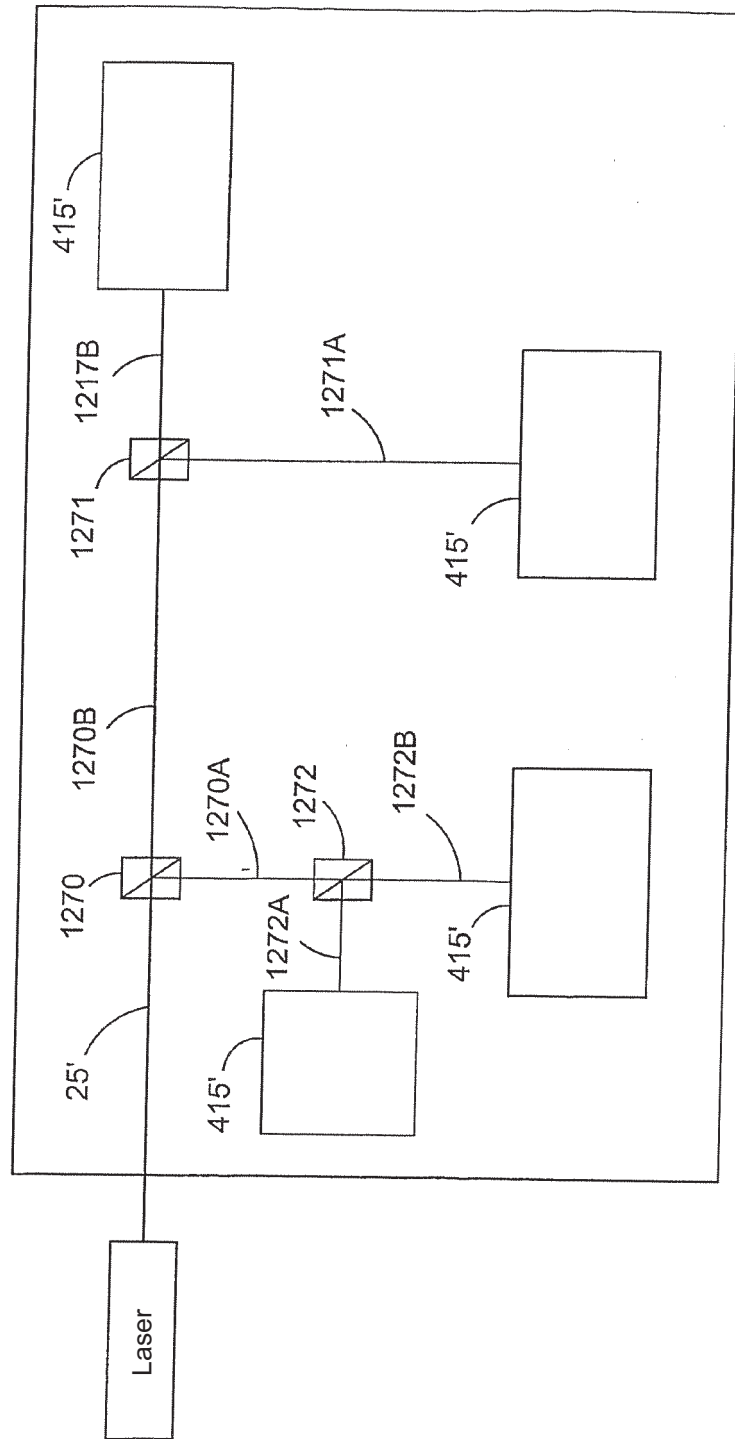


FIG. 118



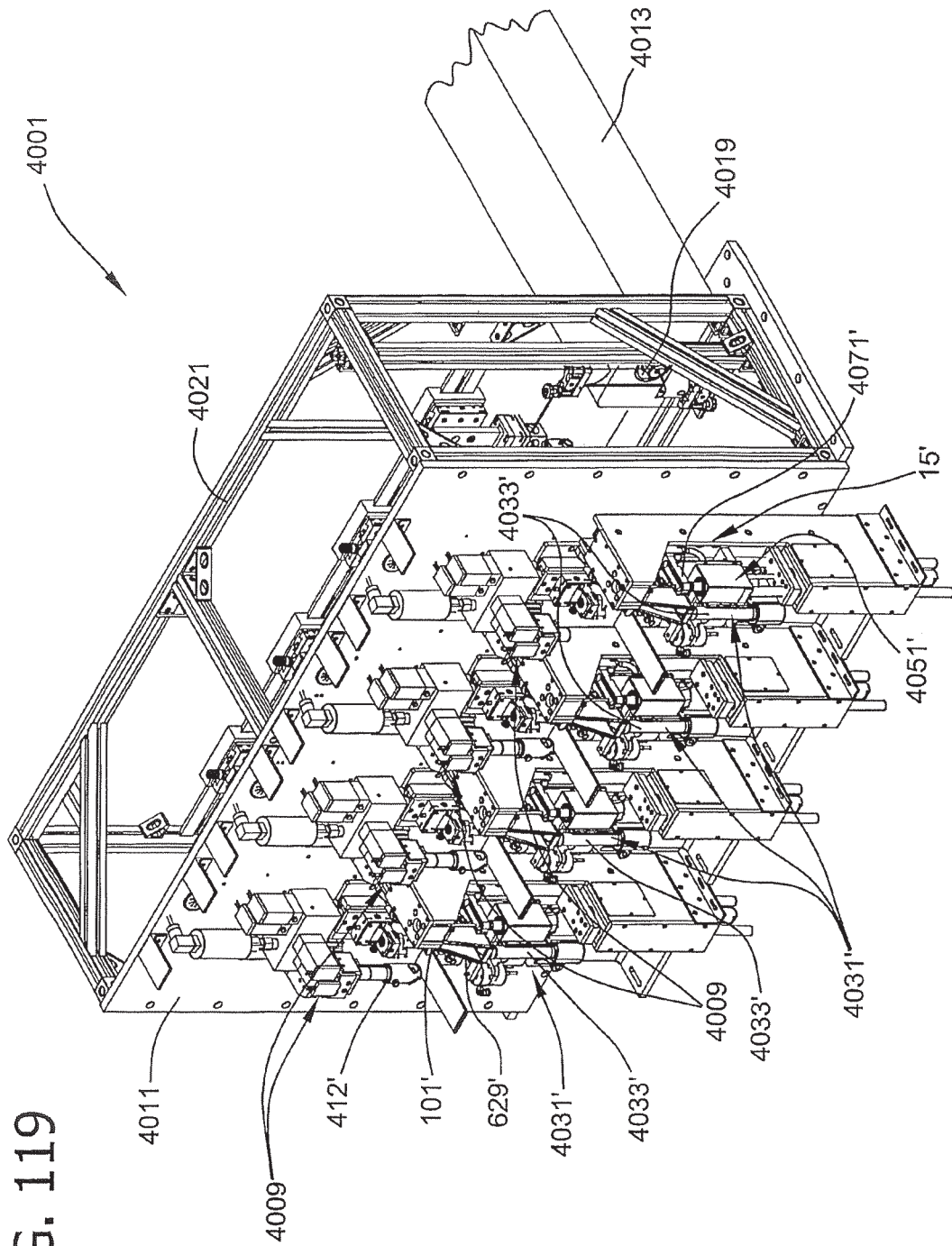


FIG. 119

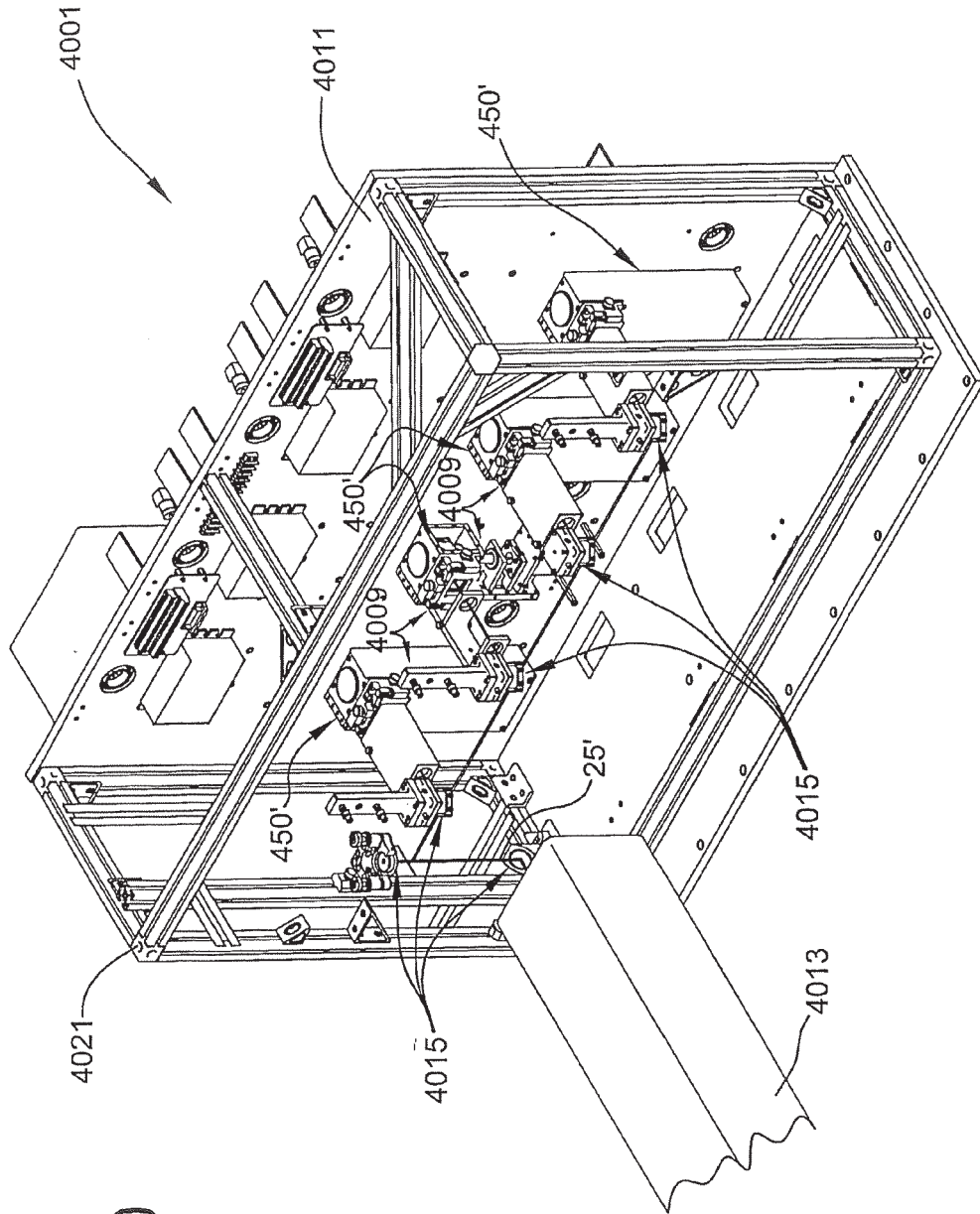


FIG. 120

FIG. 121

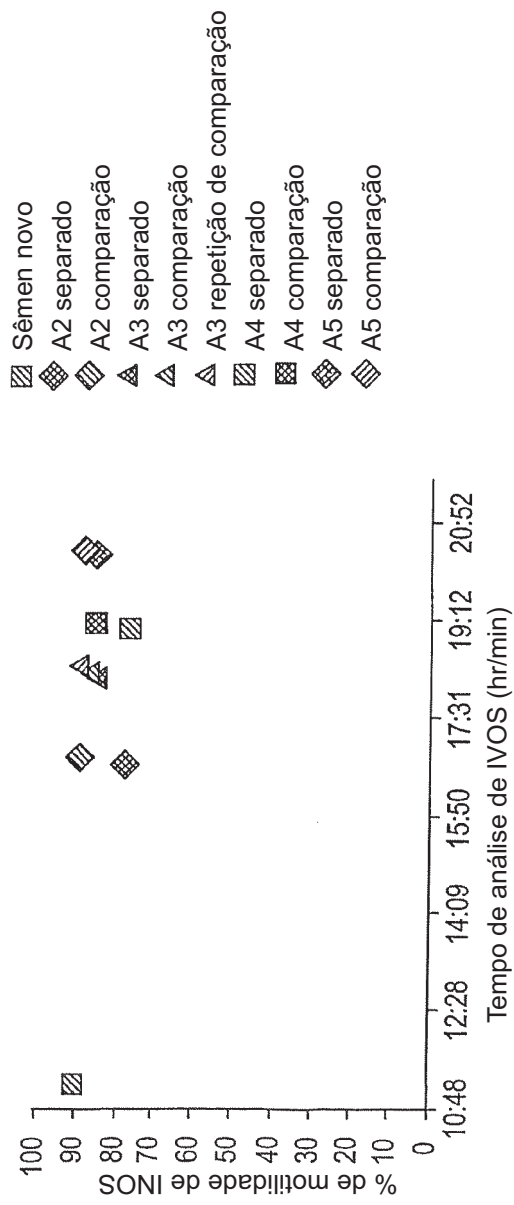


FIG. 122

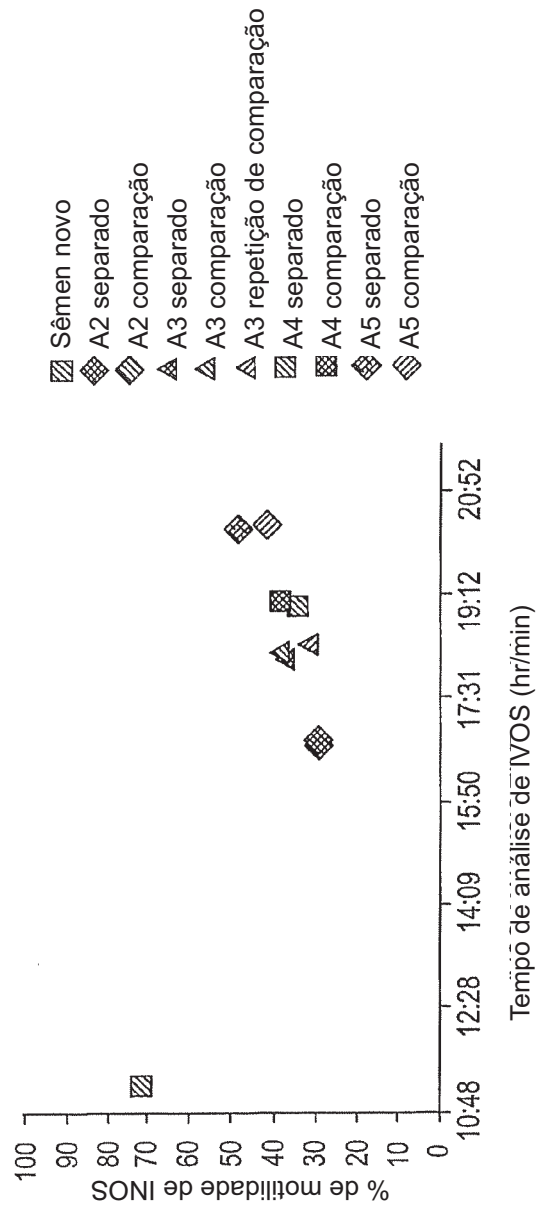


FIG. 123

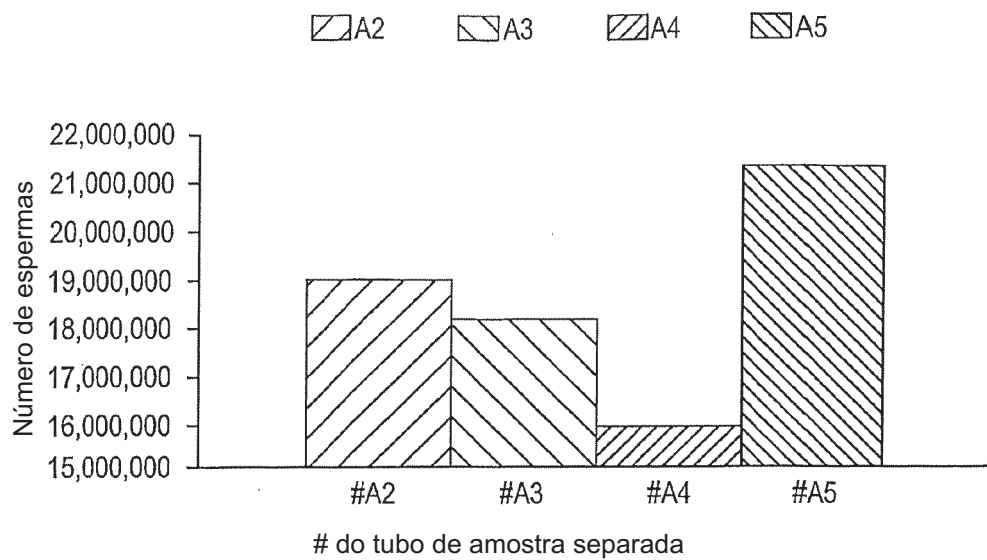


FIG. 124

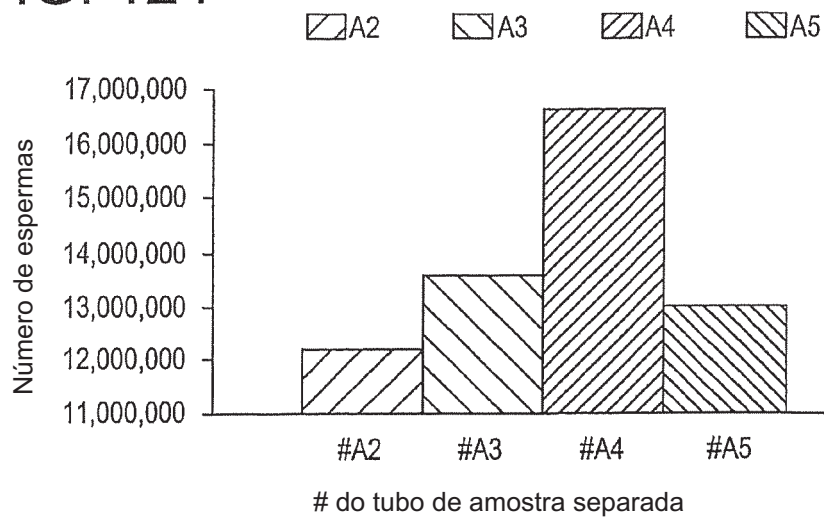


FIG. 125

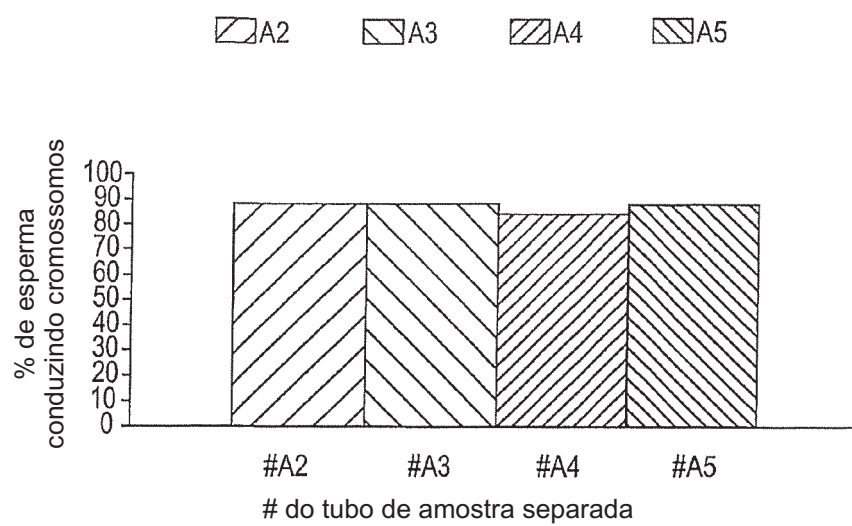


FIG. 126

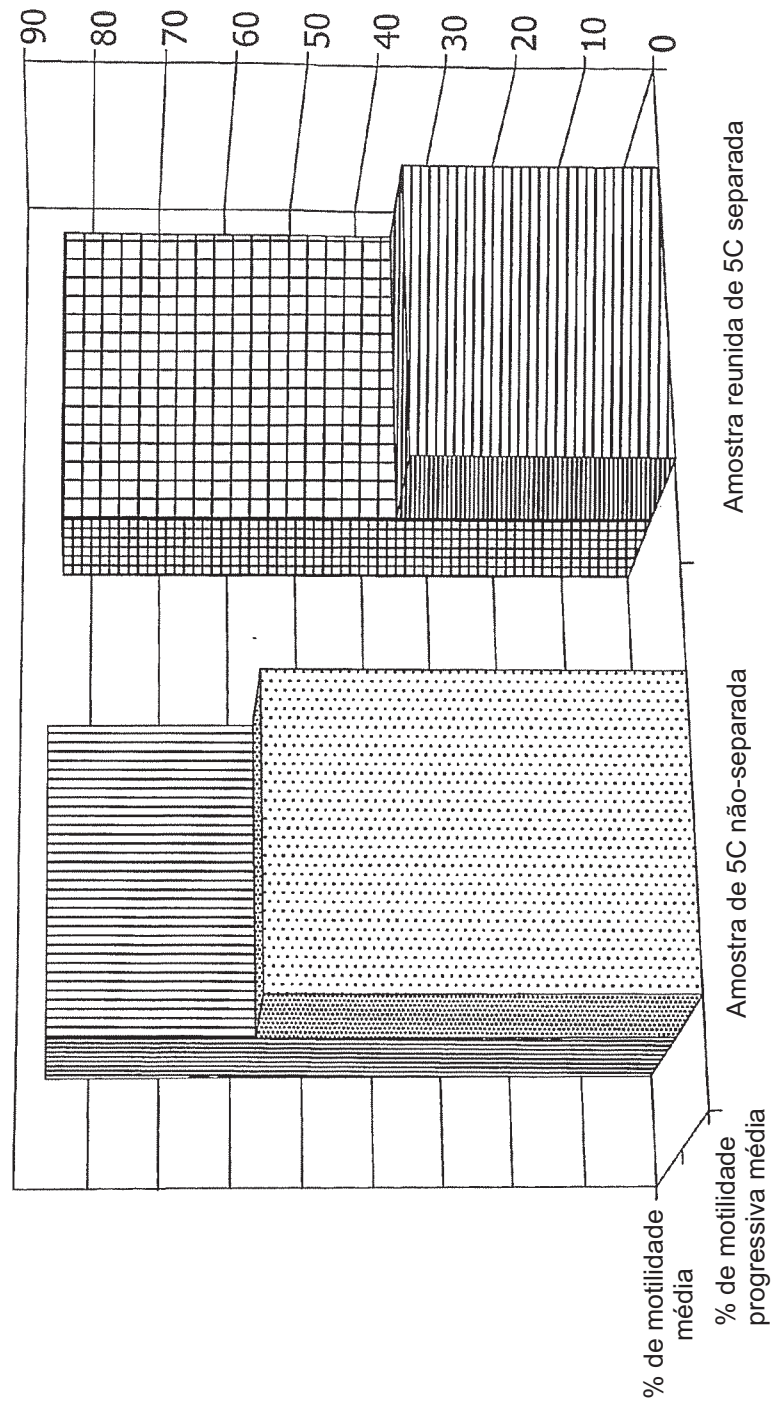


FIG. 127

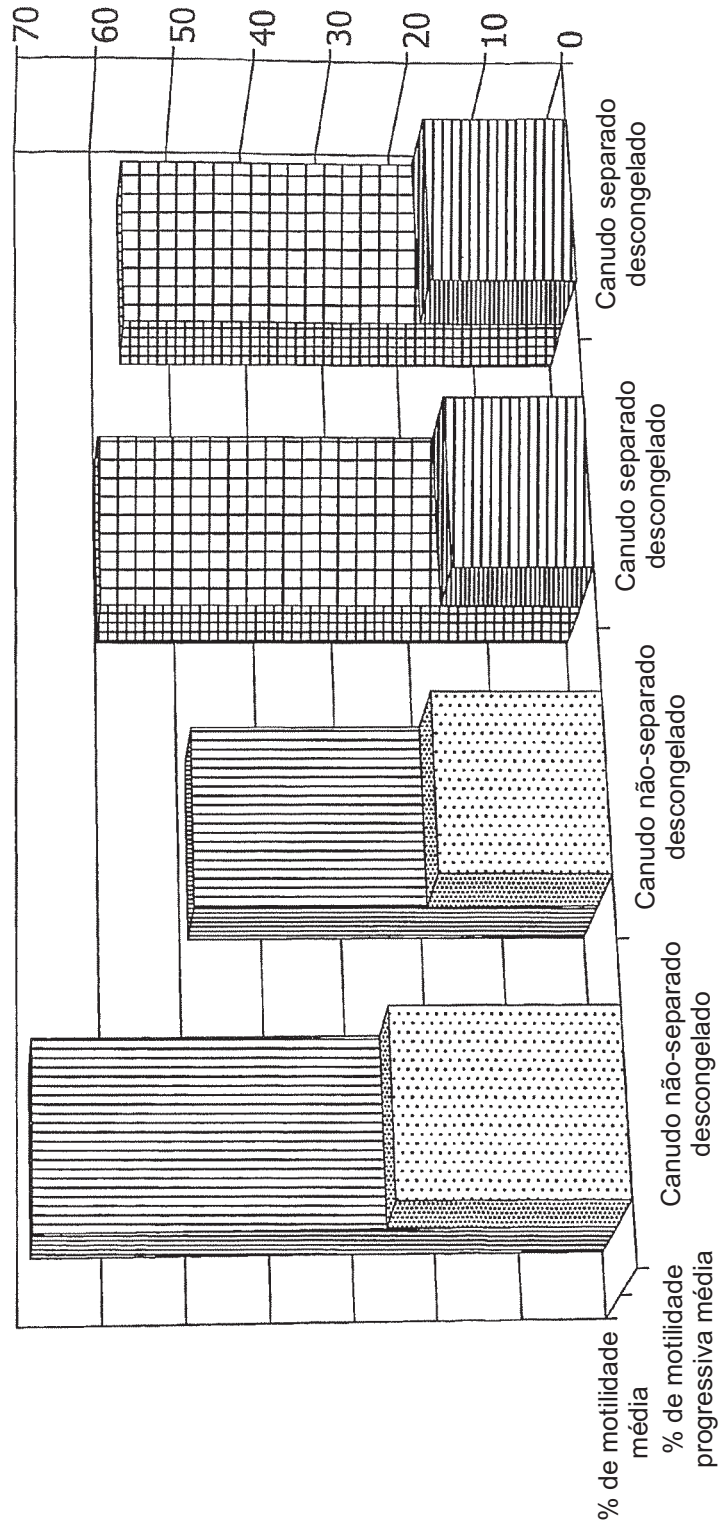


FIG. 128

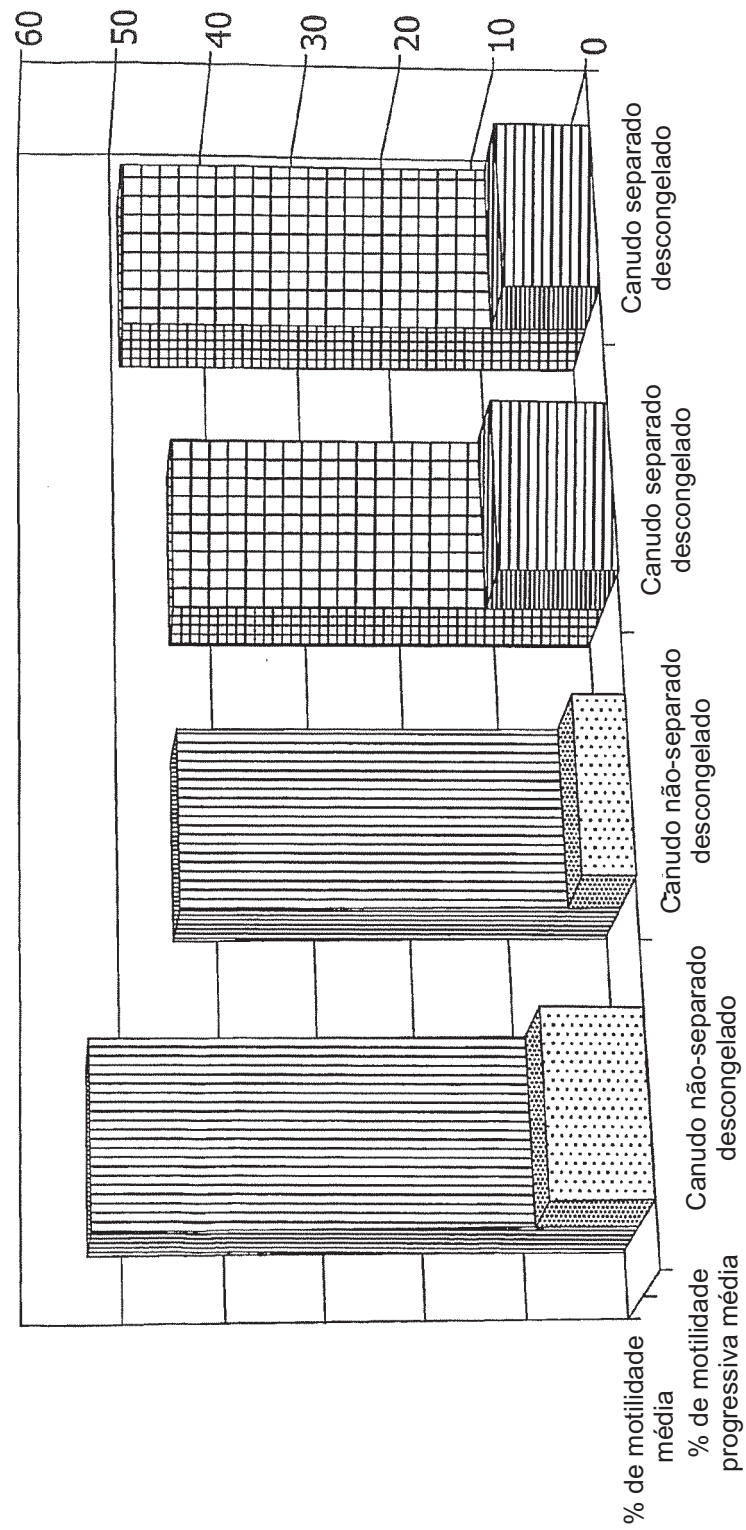


FIG. 129

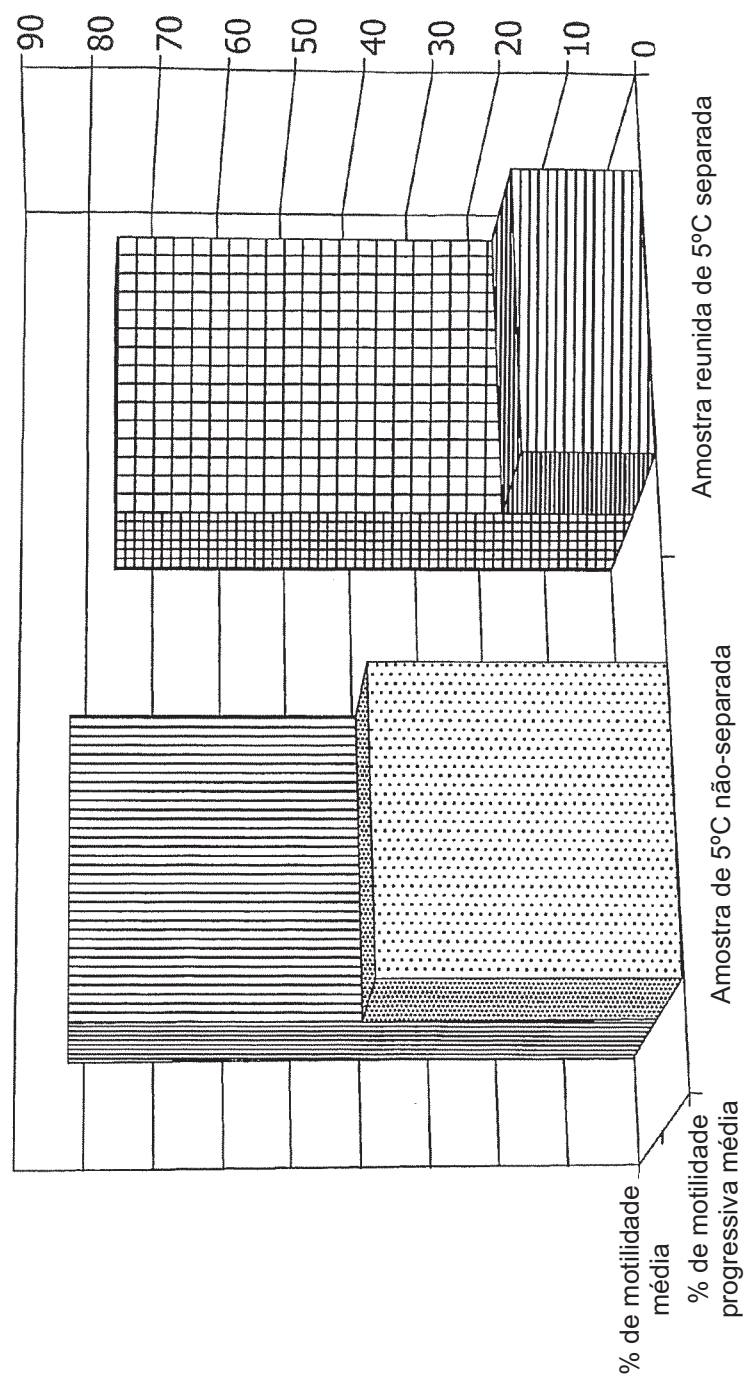


FIG. 130

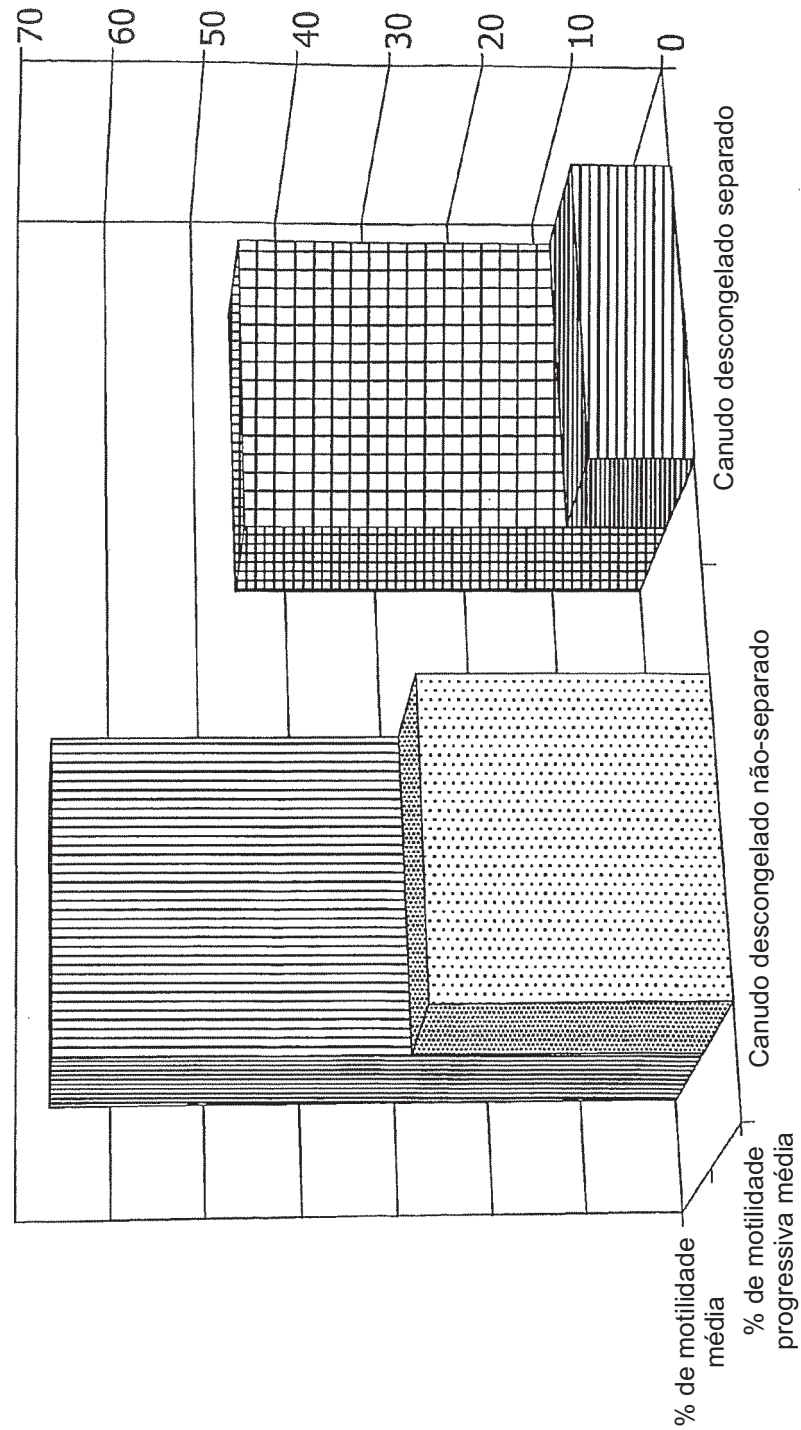
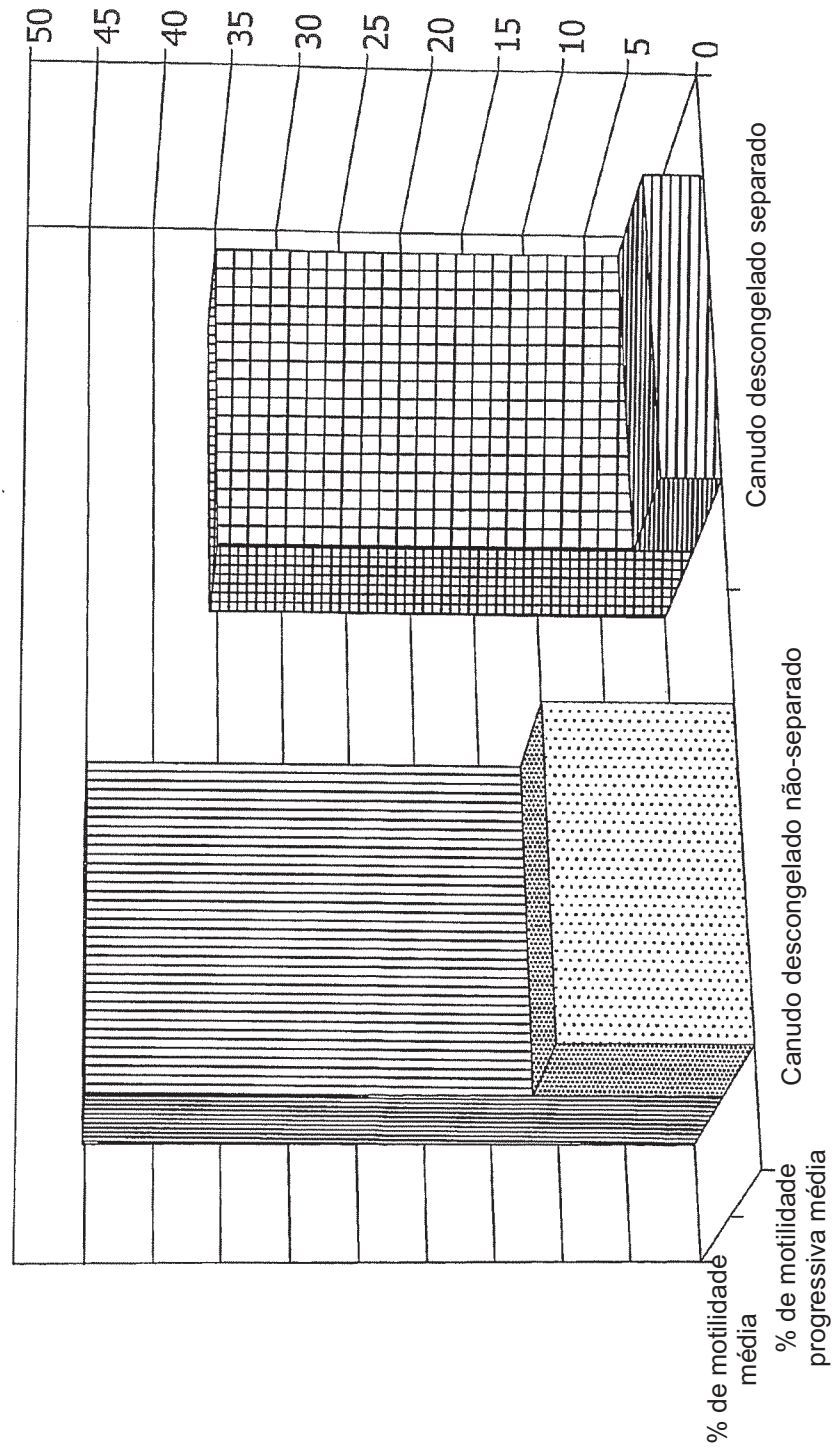


FIG. 131



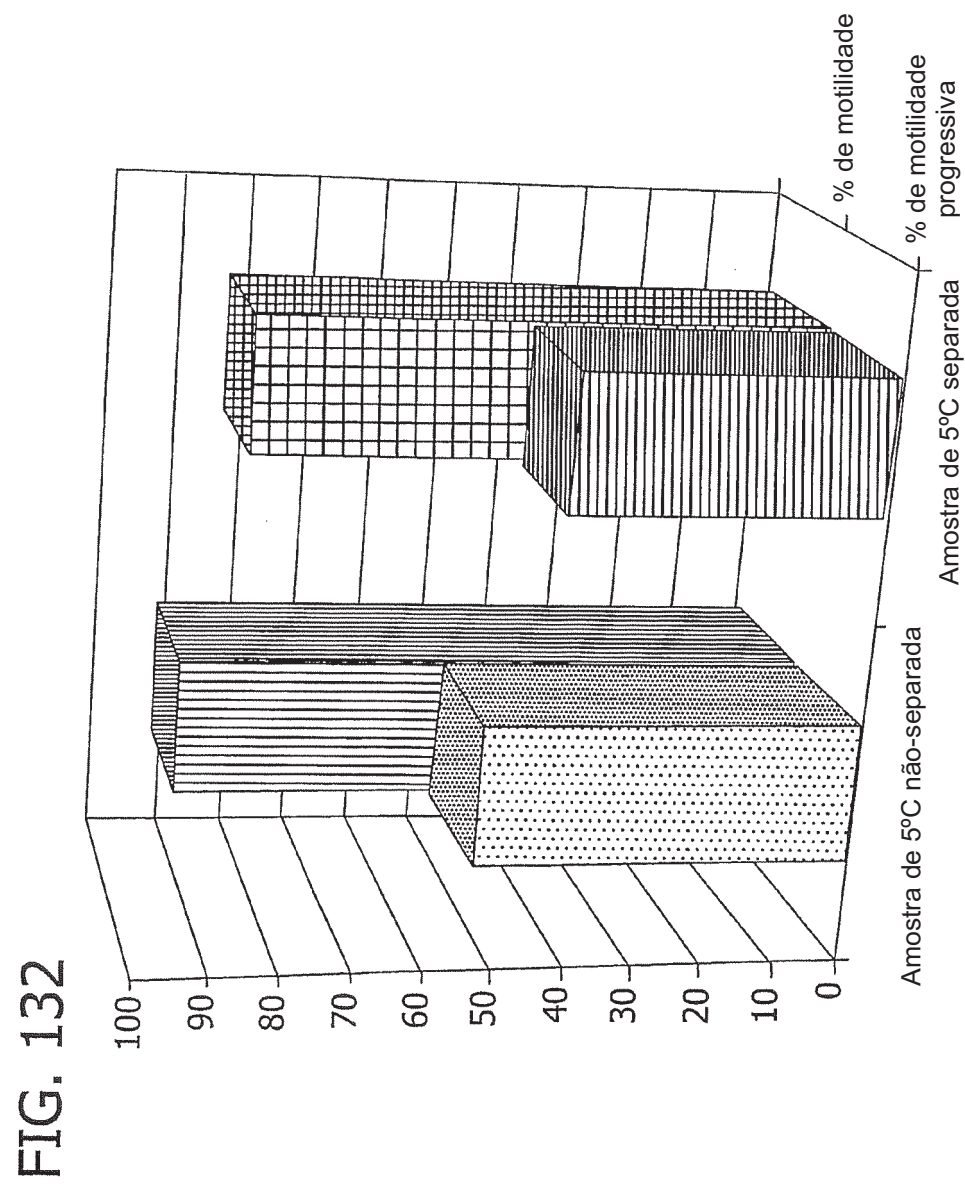
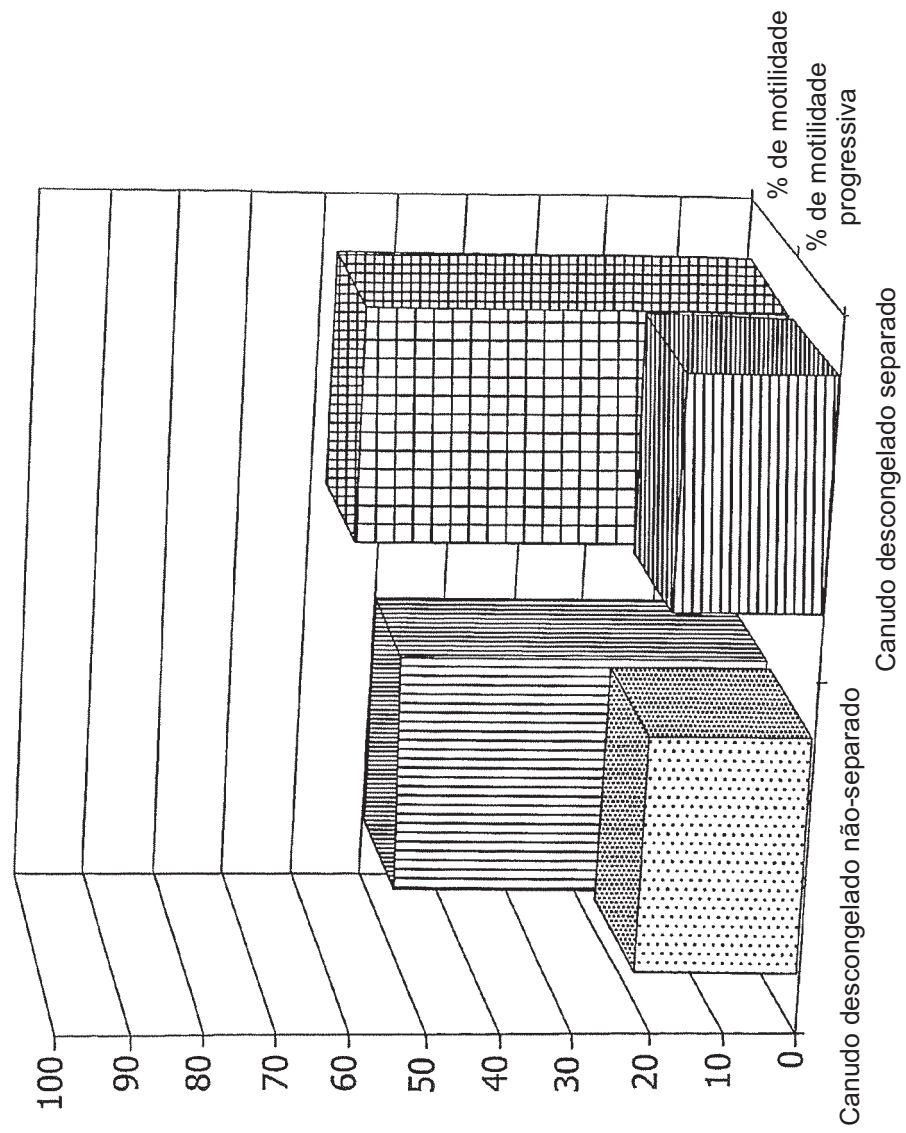


FIG. 133



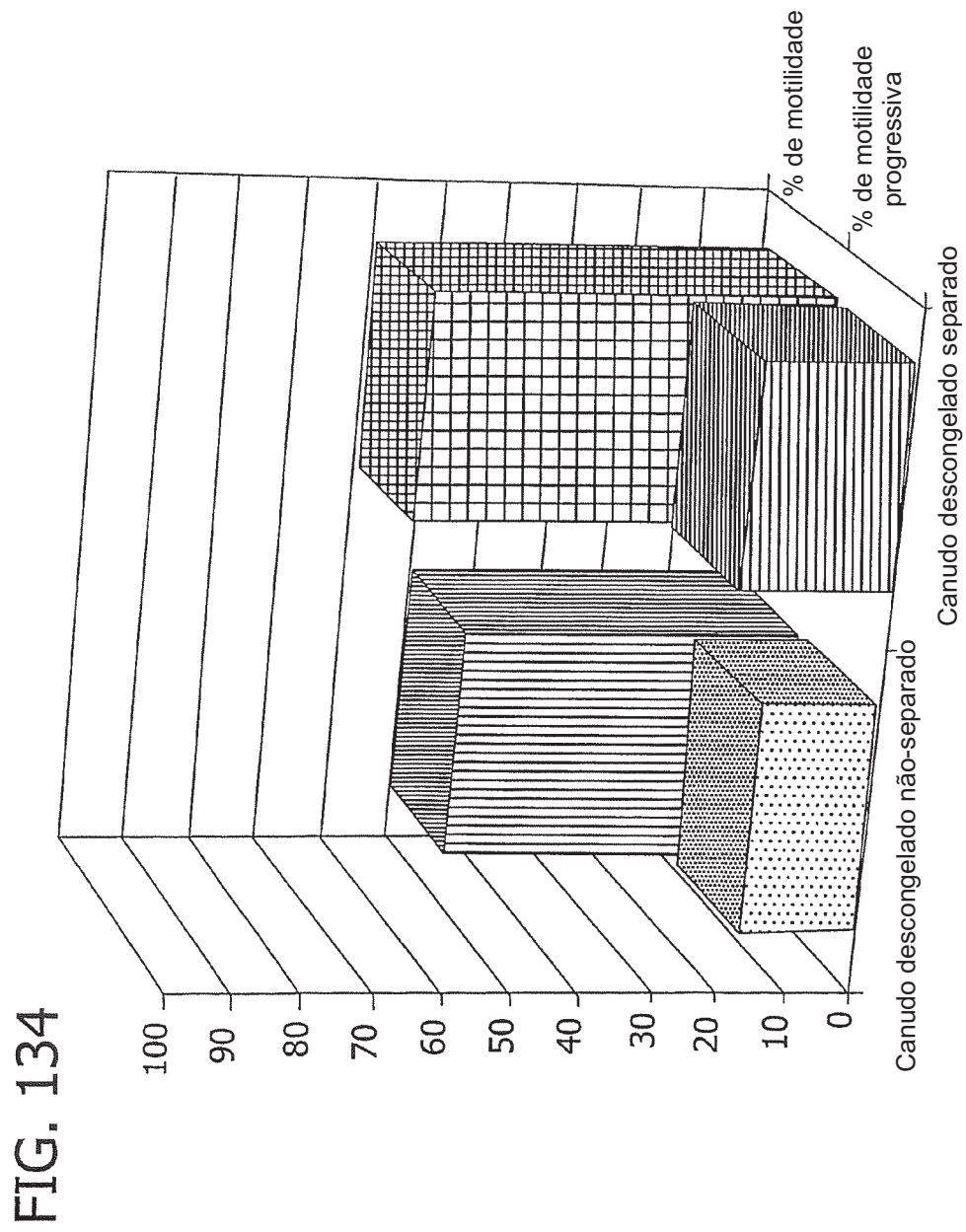


FIG. 135

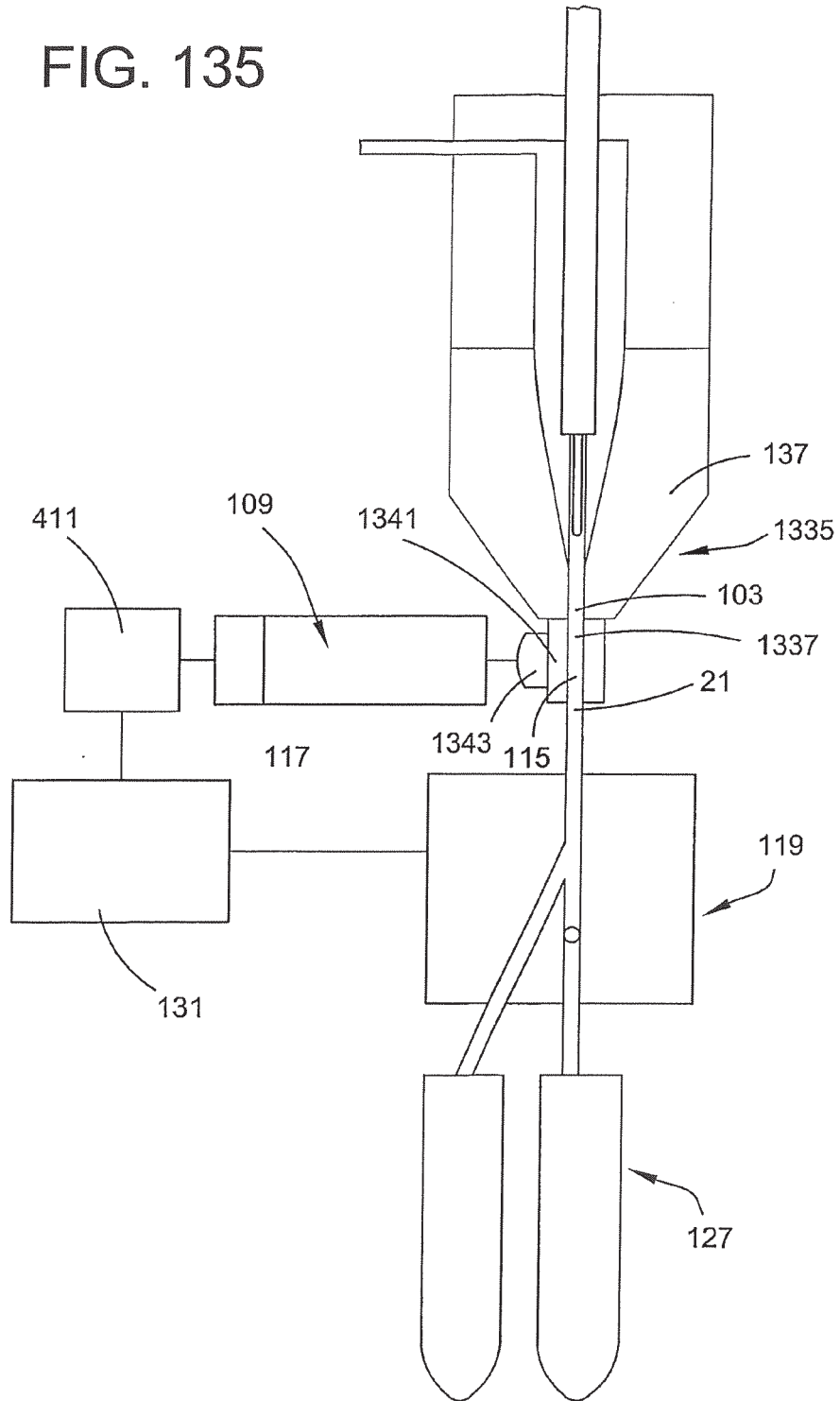


FIG. 136

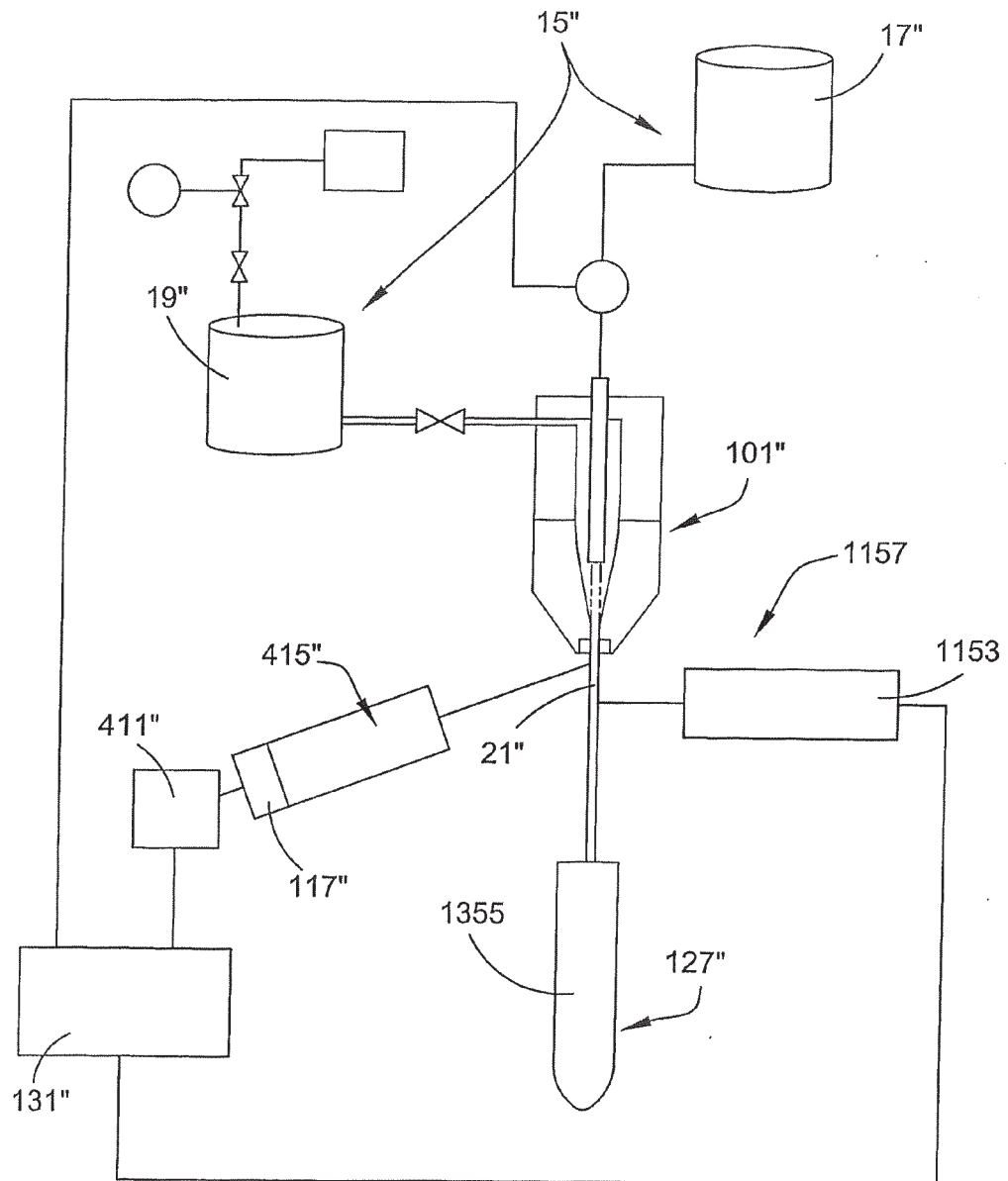


FIG. 137

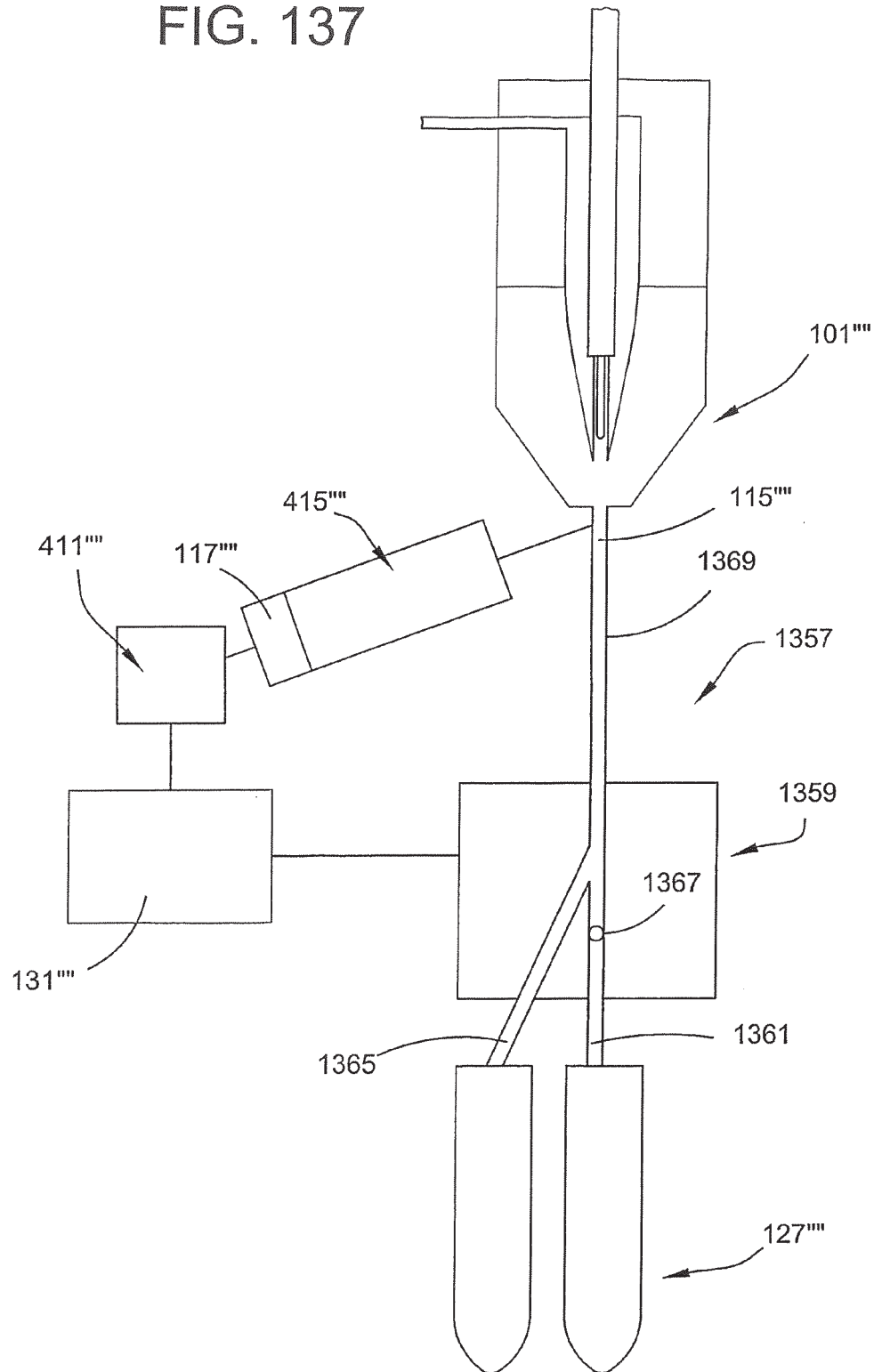


FIG. 138

