



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

**(11) PI 0823085-4 B1**

**(22) Data do Depósito: 21/08/2008**

**(45) Data de Concessão: 23/10/2018**



---

**(54) Título: APARELHO DE ANÁLISE DE CÉLULA E MÉTODO DE RETROASSENTAMENTO DE CITÔMETRO DE FLUXO**

**(51) Int.Cl.: G01N 33/48; C12M 1/34**

**(73) Titular(es): XY, LLC**

**(72) Inventor(es): JOHNATHAN C. SHARPE; KENNETH M. EVANS**

**(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/02/2011**

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**APARELHO DE ANÁLISE DE CÉLULA E MÉTODO DE RETROASSENTAMENTO DE CITÔMETRO DE FLUXO**".

CAMPO TÉCNICO

5 A presente invenção refere-se a modalidades da tecnologia da invenção que dizem respeito geralmente à análise de partícula. Mais particularmente, certas modalidades da tecnologia da invenção se referem à análise de células esféricas usando citômetros de fluxo e aparelho à base de microfluídicos e, possivelmente, classificando tais células esféricas (por exemplo, células de esperma).

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

Aparelho de análise de célula, incluindo citômetros de fluxo e analisadores microfluídicos são convencionalmente usados para analisar e, às vezes, classificar células. Se de modo a classificar células de esperma de cromossomo X de células de esperma de cromossomo Y, ou efetuar alguma  
15 outra análise de partícula (por exemplo, análise de célula), citômetros de fluxo em particular, têm um aparelho de análise de reputação estabelecida como efetiva, embora imperfeita. Aparelhos caracterizando tecnologias microfluídicas, enquanto representando uma aproximação promissora ao problema difícil de análise rápida de partícula, têm uma reputação menos estabelecida e, é atualmente o objeto de muita atenção e esforço de desenho inovador; conseqüentemente, eles não são usados comercialmente para a  
20 extensão que os citômetros de fluxo "tentados e verdadeiros" são.

Não obstante, conforme mencionado, aqueles usando citômetros  
25 de fluxo seriam aperfeiçoamentos bem-vindos, especialmente aqueles que aumentam a proporção de células que analisam os resultados são seguros. Por exemplo, os resultados de análise de 25% a 40% de células de esperma que os citômetros de fluxo convencionalmente melhores analisam não são seguros; tais células tipicamente são desgastadas. Naturalmente, particularmente nas aplicações onde as células de esperma analisadas são particularmente valiosas (esperma de um touro premiado, uma espécie ameaçada,  
30 como, mas dois exemplos), tal desgaste é altamente indesejável. Adicional-

mente, tal desgaste vem com o tempo de uso do aparelho de desgaste, e

5 pode desencorajar os proprietários de, por exemplo, touros premiados, de vender seu sêmem de touro para classificação. Tais problemas, em geral, não são únicos para aplicações de classificação de esperma; de fato, qualquer aplicação que procura analisar corretamente (isto é, de modo a produzir resultados seguros) células esféricas pode verificar que citômetros de fluxo resultam em 25% a 40% de células desgastadas.

10 O problema específico com citômetros de fluxo, e, talvez, certos aparelhos microfluídicos, origina-se da dificuldade de se orientar totalmente as células (no plano que é ortogonal ao fluxo), como muitos desenhos de citômetro de fluxo, de modo a analisar corretamente células esféricas (incluindo, mas não limitado a células de esperma) não requer somente que uma célula seja orientada relativo a um eixo de fluxo (tal que o eixo longo de célula é paralelo ao eixo de fluxo, que é relativamente fácil de se fazer no todo, se não 98+% de células que passam através do canal), mas também que a

15 célula seja corretamente radialmente orientada, tal que o eixo longo da seção transversal de célula de fluxo ortogonal (tipicamente uma seção transversal não circular) é alinhado com uma linha de alinhamento de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida que é definida pelo canal.

20 A razão para a necessidade de tal orientação radial tem que fazer com o fato que as leituras de detector de (EMR) eletromagnético mais seguras (por exemplo, leituras de intensidade de EMR emitida como um resultado da iluminação de célula): (1) são de EMR (radiação eletromagnética) emitida fora de um lado lateral (conforme oposto à borda) da célula/porção de célula; e (2)

25 resulta quando a célula é iluminada após projeção de EMR em um lado lateral. Tais leituras seguras podem então serem comparadas para produzir conclusões precisas sobre uma característica intrínseca da célula (por exemplo, se uma célula de esperma suporta um cromossomo X ou Y).

30 De modo a alcançar tais leituras seguras, certos desenhos de citômetro de fluxo conhecidos empregam um canal de orientação radial (incluindo uma extremidade radial de bocal de orientação e/ou uma agulha de injeção chanfrada, como exemplos) designado para orientar radialmente uma

célula tal que um projetor de EMR fixo projete em um lado lateral da célula (por exemplo, o lado lateral de uma seção transversal de fluxo ortogonal de uma cabeça de célula de esperma) e EMR emitida de um lado lateral da célula como um resultado de tal iluminação (por exemplo, como um resultado de fluorescência por DNA manchado que são iluminados) pode ser lida por um detector fixo. Contudo, de modo a determinar se uma célula está em uma posição radialmente totalmente orientada, um detector de EMR diferente é posicionado para detectar EMR emitida a partir da borda da célula totalmente orientada (por exemplo, uma borda de uma seção transversal de fluxo ortogonal de uma cabeça de célula de esperma); leituras deste detector de "borda" "pretendidas" são comparadas com as leituras do detector de "lado" "pretendido". Se, de fato, a leitura a partir do detector de "borda" pretendida (que pode ser referida para proporcionar informação relativa à referida orientação de célula) se refere à leitura do detector de "lado" pretendida em uma maneira que é encontrada durante uma orientação total radial (por exemplo, a leitura a partir do detector de "borda" pretendida é duas vezes a leitura do detector de "lado" pretendida), então a orientação radial pretendida de tal célula foi, de fato, efetuada, a célula foi iluminada corretamente (por exemplo, de um lado lateral), e a leitura a partir do detector estabelecido para detectar EMR emitida fora do lado lateral da célula (novamente, um lado lateral de uma seção transversal de célula de fluxo ortogonal) pode ser usada para produzir uma conclusão como para uma característica intrínseca da célula (por exemplo, se a célula está suportando cromossomo X ou suportando cromossomo Y).

Tal protocolo convencional de "dois detectores ortogonais" assenta no efeito de artefato bem conhecido onde, por exemplo, a intensidade de EMR emitida fora da borda de uma seção transversal de fluxo ortogonal da cabeça de uma célula de esperma como um resultado de um lado lateral impingindo iluminação de tal célula é duas vezes maior que de EMR emitida fora do lado lateral de uma seção transversal de fluxo ortogonal da cabeça de tal célula de esperma como um resultado de tal iluminação. Em geral, o protocolo de segurança de orientação radial total básica é uma maneira efe-

5 tiva para determinar se uma leitura de detector é segura; ele é, de fato, empregado em aspectos da tecnologia da invenção. Contudo, a configuração de projetor e detector de EMR convencional – enquanto adequada para determinar quando uma célula é orientada radialmente completamente – não  
10 determina o problema de como gerar leituras seguras de células que não são orientadas radialmente completamente. Os aspectos da tecnologia da invenção aqui revelados procuram alcançar leituras seguras de células que, usando-se sistemas convencionais, iriam se desgastar (porque, naturalmente, sua orientação menos do que total radial torna as leituras do detector in-  
15 seguras). Como tal, aspectos da tecnologia da invenção podem reduzir desgaste conforme comparado com tecnologias convencionais. Aspectos da tecnologia da invenção, particularmente aqueles que procuram aumentar a percentagem de células analisadas a qual conclusões seguras com relação a uma característica de célula intrínseca (novamente, toda célula que é ilu-  
20 minada e cuja EMR emitida é detectada, indiferente de se tal célula é totalmente orientada é considerada uma célula analisada), pode capacitar retro-  
25 assentamento de citômetros de fluxo convencionais de modo a aumentar tal percentagem.

Aspectos adicionais da tecnologia da invenção dirigem-se a con-  
20 figurações de iluminação de célula em que pelo menos um projetor de radiação eletromagnética adicional está localizado em fluxo descendente de um "fluxo mais ascendente", ou primeiro projetor de EMR, onde todos tais proje-  
tores (por exemplo, um refletor ou uma fonte de EMR) são estabelecidos para efetuar a iluminação de célula por projeção de radiação eletromagnéti-  
25 ca na célula. Tais modalidades de "iluminação espaçada axialmente" da tecnologia da invenção, que, similarmente as tecnologias de detector de "eixo externo", podem encontrar aplicação particular não somente para analisar sistemas que procuram células orientadas radialmente completamente, mas também para sistemas que não procuram células orientadas radialmente  
30 completamente. De fato, aspectos da tecnologia da invenção de "iluminação espaçada axialmente", particularmente aqueles em que projetores de EMR definem eixos de projetor de fluxo ortogonal que juntos definem um ângulo

diferente de zero (isto é, onde os eixos, novamente, cada em um plano axialmente separado de fluxo ortogonal, quando revestido, definem um ângulo diferente de zero) podem ser capaz de reduzir a percentagem de células que são desperdiçadas em sistemas de orientação radial; onde um número suficiente de tais projetores de EMR axialmente espaçados são assim estabelecidos, percentagens aceitáveis de células como para qual células de resultados de detecção EMR emitida segura podem ser obtidos mesmo em sistemas sem orientação.

Como tal, pelo menos uma modalidade da tecnologia da invenção procura reduzir a percentagem de células que são desperdiçadas em sistemas de análise de orientação radial.

Pelo menos uma modalidade da tecnologia da invenção procura reduzir a percentagem de células que são desperdiçadas em sistemas de análise que não procuram células orientadas radialmente

Pelo menos uma modalidade da tecnologia da invenção procura capacitar retroassentamento de sistemas de orientação radial existentes de modo a reduzir a percentagem de células que são desperdiçadas, talvez por 10% a 20%.

Um objetivo de pelo menos uma modalidade da tecnologia da invenção é proporcionar um sistema de análise que obtém leituras de detector de EMR emitidas seguras de células de sistemas da técnica anterior são incapazes de se detectar seguramente.

Um objetivo de pelo menos uma modalidade da tecnologia da invenção é proporcionar um sistema de iluminação múltiplo configurado de modo a iluminar células de vários ângulos, desse modo, ou: obtendo-se leituras de EMR emitidas seguras de células que, em sistemas de orientação radial, procederia de outro modo, a desperdício; ou obtenção de percentagens aceitáveis de células analisadas tendo leituras de EMR seguras em sistemas de análise que não procuram células radialmente orientadas.

Um objetivo de pelo menos uma modalidade da tecnologia da invenção é proporcionar um sistema de iluminação múltiplo que ilumine células somente para a extensão necessária.

Um objetivo de pelo menos uma modalidade da tecnologia da invenção é obter leituras de detector seguras – leituras que podem ser usadas para produzir informação precisa relativa a uma característica de célula intrínseca – de uma célula cuja orientação radial é de 10 a 45 graus fora da orientação radial total.

Naturalmente, outros objetivos e vantagens da tecnologia da invenção são revelados na revelação aqui provida, se explicitamente ou implicitamente.

#### DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Modalidades particulares da tecnologia da invenção se referem à tecnologia de "detector de eixo externo" que emprega um terceiro detector exibindo um eixo de fluxo ortogonal que é de 30 graus a 60 graus de uma linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida, em adição ao emprego de um quarto detector cujo eixo de fluxo ortogonal é ortogonal àquele do terceiro detector. Modalidades particulares da tecnologia da invenção se referem à tecnologia de "iluminação espaçada axialmente" caracterizando mais do que um local de iluminação de célula, onde, outro do que o local de iluminação de fluxo mais ascendente, todo(s) local(is) de iluminação é/são de fluxo descendente de pelo menos um outro local de iluminação. Modalidades particulares da tecnologia da invenção podem caracterizar ambas as tecnologias.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura IA mostra uma modalidade da tecnologia de detector de eixo externo (eixo de fluxo aparecendo verticalmente na página).

figura IB mostra uma célula de esperma, um dos muitos tipos de células que podem ser analisados pelo aparelho ou de acordo com métodos da tecnologia da invenção.

figura 2 mostra uma modalidade da tecnologia de detector de eixo externo; o terceiro e quarto detectores de EMR são configurados para não coletar qualquer EMR que se desloca em um plano de fluxo ortogonal (eixo de fluxo aparecendo verticalmente na página).

figura 3 mostra uma seção transversal de um bocal de orienta-

ção quando visto de cima para baixo do eixo de fluxo (eixo de fluxo na página).

figura 4 mostra uma vista plana aérea (acima), com o eixo de fluxo na página, e uma vista lateral projetada associada com este (abaixo), de detectores em um plano de fluxo ortogonal e conforme pode ser configurado sobre um local de iluminação em uma modalidade possível da tecnologia de detector de eixo externo da invenção ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção. Naturalmente, particularmente conforme se refere à tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção, tal local de iluminação pode ser um de uma pluralidade de locais de iluminação axialmente espaçados.

Figura 5 mostra uma vista plana aérea (acima), com o eixo de fluxo na página, com o eixo de fluxo na página, e uma vista lateral projetada associada com este (abaixo), de detectores em um plano de fluxo ortogonal e conforme pode ser configurado sobre um local de iluminação em uma modalidade possível da tecnologia de detector de eixo externo da invenção ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção. Naturalmente, particularmente conforme relacionado à tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção, tal local de iluminação pode ser um de uma pluralidade de locais de iluminação axialmente espaçados.

Figura 6 mostra uma vista plana aérea (acima), com o eixo de fluxo na página, e uma vista lateral projetada associada com este (abaixo), de detectores em um plano de fluxo ortogonal e conforme pode ser configurado sobre um local de iluminação em uma modalidade possível da tecnologia de detector de eixo externo da invenção ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção. Naturalmente, particularmente conforme se relaciona a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção, tal local de iluminação pode ser um de uma pluralidade de locais de iluminação axialmente espaçados.

Figura 7 mostra ângulos de coleta de detectores de EMR conforme eles podem ser configurados relativo a uma célula orientada radialmente e completamente, em um plano de fluxo ortogonal, em um local de

iluminação (com eixo de fluxo na página) em uma modalidade possível da tecnologia de detector de eixo externo da invenção ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção. Naturalmente, particularmente conforme se relaciona a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção, tal local de iluminação pode ser um de uma pluralidade de locais de iluminação espaçados axialmente. Nesta e nas Figuras 8 a 13, o círculo externo mostrado pode ser ou uma seção transversal de queda ou uma seção transversal de canal microfluídico. No centro de tal círculo (Figuras. 7-13) é mostrado uma seção transversal de célula (com seus dois lados laterais, um acima do outro) e suas duas bordas (ambas unindo os lados laterais, uma borda na direita e uma na esquerda)). Naturalmente, esta é somente uma geometria de seção transversal de célula representativa; as células analisadas podem tomar muitas formas possíveis, e certamente não são limitadas à forma mostrada. Adicionalmente, na mesma veia, lados laterais não necessitam serem planos conforme mostrado e as bordas não necessitam serem semicirculares conforme mostrado.

Figura 8 mostra ângulos de coleta de detectores de EMR visto que eles podem ser configurados relativo a uma célula orientada radialmente e completamente, em um plano de fluxo ortogonal, em um local de iluminação (com eixo de fluxo na página) em uma modalidade possível da tecnologia de detector de eixo externo da invenção ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção. Naturalmente, particularmente conforme se relaciona a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção, tal local de iluminação pode ser um de uma pluralidade de locais de iluminação axialmente espaçados.

Figura 9 mostra ângulos de coleta de detectores de EMR conforme eles podem ser configurados relativos a uma célula orientada radialmente e completamente, em um plano de fluxo ortogonal, em um local de iluminação (com eixo de fluxo na página) em uma modalidade possível da tecnologia de detector de eixo externo da invenção ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção. Naturalmente, particularmente conforme se relaciona a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da

invenção, tal local de iluminação pode ser um de uma pluralidade de locais de iluminação axialmente espaçados.

Figura 10 mostra ângulos de coleta de detectores de EMR conforme eles podem ser configurados relativo a uma célula orientada radialmente e completamente, em um plano de fluxo ortogonal, em um local de 5 iluminação (com eixo de fluxo na página) em uma modalidade possível da tecnologia de detector de eixo externo da invenção ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção. Naturalmente, particularmente conforme se relaciona a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da 10 invenção, tal local de iluminação pode ser um de uma pluralidade de locais de iluminação axialmente espaçados.

Figura 11 mostra ângulos de coleta de detectores de EMR conforme eles podem ser configurados relativo a uma célula orientada radialmente e completamente, em um plano de fluxo ortogonal, em um local de 15 iluminação (com eixo de fluxo na página) em uma modalidade possível da tecnologia de detector de eixo externo da invenção ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção. Naturalmente, particularmente conforme se relaciona à tecnologia de iluminação espaçada axialmente da 20 invenção, tal local de iluminação pode ser uma de uma pluralidade de locais de iluminação axialmente espaçados.

Figura 12 mostra ângulos de coleta de detectores de EMR conforme eles podem ser configurados relativo a uma célula orientada radialmente e completamente, em um plano de fluxo ortogonal, em um local de 25 iluminação (com eixo de fluxo na página) em uma modalidade possível da tecnologia de detector de eixo externo da invenção ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção. Naturalmente, particularmente conforme se relaciona à tecnologia de iluminação espaçada axialmente da 30 invenção, tal local de iluminação pode ser um de uma pluralidade de locais de iluminação axialmente espaçados.

Figura 13 mostra ângulos de coleta de detectores de EMR conforme eles podem ser configurados relativo a uma célula orientada radialmente e completamente, em um plano de fluxo ortogonal, em um local de

iluminação (com eixo de fluxo na página) em uma modalidade possível da tecnologia de detector de eixo externo da invenção ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção. Naturalmente, particularmente conforme se relaciona à tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção, tal local de iluminação pode ser um de uma pluralidade de locais de iluminação axialmente espaçados.

Figura 14 mostra uma vista lateral (acima) de uma modalidade de uma versão micro fluídica da tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção (eixo de fluxo aparece verticalmente na página), em adição a uma vista plana aérea projetada (abaixo, onde o eixo de fluxo está na página). Em versões tendo detectores de EMR associados com cada local de iluminação, os detectores na figura 14 podem ser configurados conforme mostrado em, por exemplo, qualquer das figuras 1, 2 e 4 a 13, em adição a serem configurados de acordo com dois ativadores de detector mutuamente ortogonais convencionais.

Figura 15 mostra uma vista lateral (acima) de uma modalidade de uma versão de citômetro de fluxo de jato em ar da tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção (eixo de fluxo aparece verticalmente na página), em adição a uma vista plana aérea projetada (abaixo, onde o eixo de fluxo está na página). Por razões de clareza, detectores e um sistema de análise de célula não são mostrados. O sistema de análise de célula pode ser, por exemplo, conforme mostrado nas figuras 1A e 2 (como, mas um exemplo de um sistema de classificação possível). Detectores associados com cada local de iluminação na figura 15 podem ser configurados conforme mostrado em, por exemplo, qualquer das figuras 1,2 e 4 a 13, em adição a serem configurados de acordo com dois ativadores de detector mutuamente ortogonais convencionais.

Figura 16 mostra uma vista lateral (acima) de uma modalidade de uma versão micro fluídica da tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção (eixo de fluxo aparece verticalmente na página), em adição a uma vista plana aérea projetada (abaixo, onde o eixo de fluxo está na página). Em versões tendo detectores de EMR associados com cada local

de iluminação, os detectores na figura16 podem ser configurados conforme mostrado em, por exemplo, qualquer das figuras 1,2 e 4 a 13, em adição a serem configurados de acordo com dois ativadores de detector mutuamente ortogonais convencionais.

5                    Figura 17 mostra uma vista lateral (acima) de uma modalidade de uma versão micro fluídica da tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção (eixo de fluxo aparece verticalmente na página), em adição a uma vista plana aérea projetada (abaixo, onde o eixo de fluxo está na página). Em versões tendo detectores de EMR associados com cada local  
10 de iluminação, os detectores na figura17 podem ser configurados conforme mostrado em, por exemplo, qualquer das figuras 1,2 e 4 a 13, em adição a serem configurados de acordo com dois ativadores de detector mutuamente ortogonais convencionais.

                    Figura 18 mostra uma vista lateral (acima) de uma modalidade  
15 de uma versão de um citômetro de fluxo de jato em ar da tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção (eixo de fluxo aparece verticalmente na página), em adição a uma vista plana aérea projetada (abaixo, onde o eixo de fluxo está na página). Por razões de clareza, detectores e um sistema de análise de célula não são mostrados. O sistema de análise de  
20 célula pode ser, por exemplo, conforme mostrado nas figuras 1A e 2 (conforme, mas um exemplo de um sistema de classificação possível). Detectores associados com cada local de iluminação na figura 18 podem ser configurados conforme mostrado em, por exemplo, qualquer das figuras 1,2 e 4 a 13, em adição a serem configurados de acordo com dois ativadores de de-  
25 tector mutuamente ortogonais convencionais.

                    Figura 19 mostra uma vista lateral (acima) de uma modalidade de uma versão de um citômetro de fluxo de jato em ar da tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção (eixo de fluxo aparece verticalmente na página), em adição a uma vista plana aérea projetada (abaixo, onde o eixo de fluxo está na página). Por razões de clareza, detectores e um sistema de análise de célula não são mostrados. O sistema de análise de célula pode ser, por exemplo, conforme mostrado nas figuras 1A e 2 (con-  
30

forme, mas um exemplo de um sistema de classificação possível). Detectores associados com cada local de iluminação na figura 19 podem ser configurados conforme mostrado em, por exemplo, qualquer das figuras 1,2 e 4 a 13, em adição a serem configurados de acordo com dois ativadores de detector mutuamente ortogonais convencionais.

Figura 20 mostra uma vista lateral (acima) de uma modalidade de uma versão microfluídica da tecnologia de iluminação espaçada axialmente da invenção (eixo de fluxo aparece verticalmente na página), em adição a uma vista plana aérea projetada (abaixo, onde o eixo de fluxo está na página). Em versões tendo detectores de EMR associados com cada local de iluminação, os detectores na figura 20 podem ser configurados conforme mostrado em, por exemplo, qualquer das figuras 1,2 e 4 a 13, em adição a serem configurados de acordo com dois ativadores de detector mutuamente ortogonais convencionais.

#### 15 MODOS DE EFETUAR A INVENÇÃO

Conforme mencionado anteriormente, a presente tecnologia da invenção inclui uma variedade de aspectos, que pode ser combinada em modos diferentes. As seguintes descrições são providas para listar elementos e descrever algumas das modalidades da presente invenção. Estes elementos são listados com modalidades iniciais; contudo, deve ser compreendido que eles podem ser combinados em qualquer maneira e em qualquer número para criar modalidades adicionais. Os exemplos variavelmente descritos e modalidades preferidas não devem ser construídos para limitar a presente invenção a somente os sistemas explicitamente descritos, técnicas e aplicações. Adicionalmente, esta descrição deve ser compreendida para suportar e envolver descrições e reivindicações de todas as várias modalidades, sistemas, técnicas, métodos, dispositivos e aplicações com qualquer número dos elementos revelados, com cada elemento sozinho, e também com qualquer e todas as várias permutações e combinações de todos os elementos nesta ou qualquer aplicação subsequente.

Um aspecto particular da tecnologia da invenção, que pode ser referida como tecnologia de detector de eixo externo, pode ser descrito (em

pelo menos uma modalidade) como um aparelho de análise de célula (por exemplo, um citômetro de fluxo, se de jato em ar ou outro tipo) que compreende uma fonte de célula 1 que inclui uma pluralidade de células 2 a ser analisadas, cada célula definindo um eixo longo de célula 3; um canal 4 (por exemplo, uma extremidade de bocal de orientação 5 e/ou agulha de injeção chanfrada 6 que pode formar um bocal de orientação; ou um canal microfluídico 7) que define um eixo de fluxo 8 e através do qual as células fluem; no qual as células, quando o eixo longo de célula é paralelo ao eixo de fluxo, tem pelo menos uma porção 9 que tem uma seção transversal de célula de eixo ortogonal 10 (uma seção transversal da célula que é ortogonal ao fluxo quando o eixo longo de célula é paralelo ao eixo de fluxo) que é não circular. A seção transversal de célula de fluxo ortogonal pode ter um eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal 11 e um eixo curto da seção transversal de célula de fluxo ortogonal 12 que é, tipicamente, ortogonal ao eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal 11. Deve ser notado que um eixo longo de célula é aquele eixo de célula que se alinha com um fluxo unidirecional quando a célula é conduzida por tal fluxo. Adicionalmente, o termo eixo, conforme usado em qualquer dos vários contextos aqui, não implicam necessariamente em simetria; eixos, conforme aqui usado, podem, por exemplo, serem pelo menos conceitualmente infinitos em comprimento. É também de nota que um citômetro de fluxo pode ser visto conforme empregando princípios microfluídicos, mas não é o caso que todo aparelho empregando princípios microfluídicos são citômetros de fluxo (por exemplo, citômetros de fluxo empregam tipicamente análise tipo queda, mas muitos aparelhos à base de microfluídico não, conforme frequentemente, em um canal microfluídico, análise é realizada no canal). Como tal, o termo canal microfluídico, conforme aqui usado, deve ser compreendido para incluir (em modo não limitativo) canais em que análise de célula é realizada nestes.

Adicionalmente, na tecnologia de detector de eixo externo, o canal 4 pode definir uma linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida 13 e uma linha de alinhamento

de eixo curto da seção transversal de célula de fluxo ortogonal 14 que podem ser ortogonais à linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida. O termo "pretendida" pode indicar que este pode ser o caso que (conforme é encontrado em muitos aparelhos de orientação) menos do que todas as células que passam através de um canal de orientação são orientadas tal que seu eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal se alinha com tal linha de alinhamento (embora a intenção possa ser que todas as células que passem através não sejam orientadas). Neste aspecto da tecnologia da invenção, o canal pode ser configurado para orientar as células de modo que cada célula presente na orientação total durante uma iluminação de célula, no qual, quando a célula está na orientação total: (a) o eixo longo de célula é paralelo ao eixo de fluxo, (b) o eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal é alinhado com a linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida, e (c) o eixo curto da seção transversal de célula de fluxo ortogonal é alinhada com a linha de alinhamento de eixo curto da seção transversal de célula de fluxo ortogonal.

O aparelho de tecnologia de detector de eixo externo pode compreender adicionalmente um projetor de radiação eletromagnética 15 (por exemplo, fonte de EMR 16 ou reflector de EMR 17) estabelecido para efetuar a iluminação de célula por projeção de radiação eletromagnética nas células, e um primeiro detector de EMR 21 e um segundo detector de EMR (radiação eletromagnética) 22, cada um estabelecido para detectar EMR emitida como um resultado da iluminação de célula, no qual o primeiro detector de EMR tem um ângulo de coleta de fluxo ortogonal do primeiro detector 31 que define um eixo do primeiro detector de fluxo ortogonal 41 e o segundo detector de EMR 22 tem um ângulo de coleta de fluxo ortogonal do segundo detector 32 que define um eixo do segundo detector de fluxo ortogonal 42. Os detectores de EMR podem incluir, entre outros, abertura (que pode incluir uma lente), filtro(s) e um PMT. É de notar que o ângulo de coleta de fluxo ortogonal do detector se refere a: (a) a projeção do ângulo de coleta em um plano de fluxo ortogonal 50 quando aquela luz coletada pelo detector de

EMR não se desloca em tal plano (ver, por exemplo, figuras 2 e 6); (b) o ângulo de coleta onde aquela luz coletada pelo detector de EMR se desloca em tal plano de fluxo ortogonal; e/ou (c) uma média pesada de ângulos de coleta quando o detector associado coleta EMR expressa sobre uma faixa

5 de ângulos de coleta (conforme onde a face do detector que recebe EMR é triangular ou circular (conforme, mas dois exemplos), dependendo das formas e configuração dos detectores. Os eixos definidos pelos ângulos de coleta simplesmente seccionam tais ângulos; os eixos são conceitualmente infinitos em comprimento e, como tal, não terminam na célula ou no centro

10 de qualquer círculo (ou outra figura) definido pelo fluxo. Tipicamente, o eixo do primeiro detector de fluxo ortogonal 41 é substancialmente coaxial com a linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida 13, o eixo do segundo detector de fluxo ortogonal 42 é substancialmente coaxial com a linha de alinhamento de eixo curto da seção

15 transversal de célula de fluxo ortogonal 14, e o eixo do primeiro detector de fluxo ortogonal 41 e o eixo do segundo detector de fluxo ortogonal 42 podem ser substancialmente 90 graus espaçados. É de notar que o aparelho acima descrito (isto é, um que inclui, entre outros, um primeiro e segundo detector de EMR) pode ser retroassentado para incluir terceiro e quarto detectores de

20 EMR 23, 24 conforme descrito abaixo. Como tal, este aparelho acima descrito (isto é, o aparelho de dois detectores, de célula orientada), pode ser o foco de um procedimento de retroassentamento descrito adicionalmente abaixo.

A tecnologia de aparelho de detector de eixo externo tipicamente

25 compreende um terceiro detector de EMR 23 e um quarto detector de EMR 24, cada um estabelecido para detectar EMR emitida como um resultado da iluminação de célula; o terceiro detector de EMR 23 pode ter um ângulo de coleta de fluxo ortogonal do terceiro detector 33 que define um eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal 43 e o quarto detector de EMR 24 pode ter

30 um ângulo de coleta de fluxo ortogonal do quarto detector 34 que define um eixo do quarto detector de fluxo ortogonal 44, e o eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal 43 e o eixo do quarto detector de fluxo ortogonal 44 podem

ser substancialmente 90 graus espaçados. Adicionalmente, neste aspecto da tecnologia da invenção, o eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal 43 pode ser de 30 graus a 60 graus (por exemplo, 45 graus, conforme, mas um exemplo), ou talvez 20-45 graus, a partir da linha de alinhamento de eixo  
5 longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (consequentemente o nome "detector de eixo externo"); naturalmente, tal linha se estende através da seção transversal.

Na tecnologia de aparelho de detector de eixo externo e o método de retroassentamento de citômetro de fluxo, um ou mais de cada o primeiro e segundo, e o terceiro e quarto detector de EMR 21, 22, 23, 24 pode  
10 coletar EMR que se desloca em um plano de fluxo ortogonal 50 (frequentemente em adição a também coleta de EMR que se desloca em uma direção que não é fluxo ortogonal), porque eles são assim estabelecidos. De outro modo, um ou mais de cada um dos detectores (particularmente o terceiro e o  
15 quarto) não pode coletar qualquer EMR que se desloca em uma direção ortogonal ao fluxo (ver, por exemplo, figuras 2 e 6). A linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida 13 pode definir um primeiro lado 61 (por exemplo, um "meio disco" de 180 graus visto de cima) em que é estabelecido um projetor de radiação eletro-  
20 magnética 15, e um segundo lado 62. Em certas modalidades, o eixo do segundo detector de fluxo ortogonal 42 pode estar no primeiro lado 61; em outros, ele pode estar no segundo lado 62. Desse modo também pode cada eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal 43 e o eixo do quarto detector de fluxo ortogonal 44 estar no primeiro lado 61 ou no segundo lado 62.

25 Se o aparelho é configurado de modo que tais eixos do detector estão em um lado ou no outro lado pode depender se existem artefatos óticos dianteiros/traseiros (por exemplo, onde EMR emitida (se fluorescida ou refletida) a partir do lado lateral de uma seção transversal de cabeça de es-  
perma em uma direção para o projetor de EMR é diferente de EMR emitida  
30 (se EMR fluorescida ou EMR que simplesmente passa através da célula sem absorção e excitação) a partir do lado lateral de uma seção transversal de cabeça de esperma em uma direção fora do projetor de EMR). Tais artefa-

tos, quando presentes, podem ser significantes o bastante (por exemplo, onde EMR emitida fora do lado lateral de uma seção transversal de cabeça de célula de esperma não é aproximadamente metade da EMR emitida fora da borda de tal seção transversal), tal que um protocolo simples usado para

5 avaliar se uma célula analisada é orientada radialmente e completamente não é mais apropriada para ambas tais situações (por exemplo, onde o detector alinhado com a linha de alinhamento de eixo curto de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida está no primeiro lado 61 ou no

10 segundo lado 62). Se o efeito resulta em leituras repetíveis prognosticáveis para células orientadas radialmente e completamente (por exemplo, onde EMR emitida fora do lado lateral de uma seção transversal de cabeça de esperma em uma direção para o projetor de EMR é sempre 0,8 vezes a

15 EMR emitida fora do lado lateral de uma seção transversal de cabeça de célula de esperma em uma direção distante do projetor de EMR), então talvez um protocolo diferente (por exemplo, um protocolo outro do que um que testa a presença de EMR emitida fora do lado lateral de uma seção trans-

20 versal de cabeça de esperma que é duas vezes aquela de EMR emitida fora da borda) pode ser usado. Contudo, algumas células não podem exibir tal resposta de excitação diferencial, e um protocolo simples pode ser usado, indiferente de se o eixo do segundo detector 42 está no primeiro lado 61 ou

no segundo lado 62.

Na "tecnologia de detector de eixo externo", o aparelho e o método de retroassentamento de citômetro de fluxo, tipicamente, o primeiro detector de EMR 21 pode detectar para proporcionar informação relativa à ori-

25 entação de célula e o segundo detector de EMR 22 pode detectar para proporcionar informação relativa a uma característica de célula intrínseca. Por tal razão, eles podem ser cada um caracterizado como tendo funcionalidade unitária. O terceiro detector de EMR 23 pode detectar para proporcionar in-

30 formação relativa à orientação de célula em um ponto em tempo, e informação relativa a uma característica de célula intrínseca em outro ponto em tempo; o quarto detector 24 também pode exibir tal funcionalidade dupla, ambos talvez dependendo da direção da célula radialmente orientada impro-

priamente (horária e anti-horária em um plano de fluxo ortogonal 50) distante da orientação radial completa. Isto, novamente, é em contraste a funcionalidade unitária dos primeiro e segundo detectores de EMR 21, 22 e pode ocorrer a partir da configuração dos eixos do terceiro e quarto detectores de  
5 fluxo ortogonal 43, 44 relativo ao eixo do projetor de fluxo ortogonal 70 e, mais particularmente, a simetria de tais eixos de detector sobre tal eixo de projetor. Adicionalmente, em modalidades particulares, a iluminação de célula pode ocorrer após a célula ter saído do canal (por exemplo, onde o aparelho é um citômetro de fluxo de jato em ar como na figura 1A); em um sistema  
10 microfluídico (ver, por exemplo, figura 5), tipicamente a iluminação de célula ocorre quando a célula está no canal.

No caso onde as células a serem analisadas são células de es-  
perma, a característica de célula intrínseca pode ser cromossomo X ou Y (isto é, se a célula suporta um cromossomo X ou Y). Talvez as células sejam  
15 manchadas para efetuar resposta de iluminação diferencial, tal como fluorescência diferencial; tais manchas incluem, mas não são limitadas a, aquelas que ligam DNA em um maneira que é específica de não sexo (isto é, manchas específicas de não sexo, por exemplo, uma mancha Hoechst apropriada, tal como Hoechst 33342, conforme é bem conhecido, onde quantida-  
20 des relativas de fluorescência de DNA desse modo etiquetado podem estar em proporção de massa de DNA), ou manchas que mancham somente o cromossomo X, ou, por outro lado, somente o cromossomo Y (isto é, manchas específicas de sexo, um termo amplo que inclui poliamidas específicas de sequência e anticorpos específicos de sexo). Os anticorpos específicos  
25 de sexo podem ser usados para etiquetar as células de esperma em uma mistura de manchamento. Por exemplo, um anticorpo específico de sexo pode ser conjugado com uma porção fluorescente (ou molécula relatora equivalente). Devido ao anticorpo se ligar a antígenos presentes em somente um cromossomo X ou, alternativamente, um cromossomo Y suportando cé-  
30 lula, tais células podem ser seletivamente identificadas baseado em sua fluorescência (versus a não fluorescência de uma célula não etiquetada). Além disso, mais do que um anticorpo específico de sexo, cada anticorpo tendo

uma porção fluorescente diferente fixada a este, pode ser usada simultaneamente. Isto permite diferenciação de cromossomo X e cromossomo Y suportando células baseado na fluorescência diferente de cada.

Todas as tecnologias da invenção aqui reveladas (particularmente aquelas não incorporando microfluídicos) podem se relacionar a aparelho que pode adicionalmente compreender um oscilador 80 estabelecido para oscilar as células; elas podem adicionalmente compreender um reservatório de fluido de invólucro 81; elas podem adicionalmente compreender um sistema de análise de dados eletrônico 82 (por exemplo, um sistema de análise de dados digital 83, tal como um sistema de dado computadorizado de análise que processa em algum modo dados numéricos, tais como leituras do detector) em cujas leituras a partir dos detectores de EMR são admitidas. O sistema de análise de dados eletrônicos, particularmente quando incorporando eletrônicos digitais (isto é, um sistema de análise de dados digital), pode facilitar o uso de multi-canais, multi-detectores e ainda iluminação radial que converge de substancialmente todos os pontos ao redor de uma célula (por exemplo, iluminação radial de 360 graus) e, de fato, aumenta a velocidade (por exemplo, produção de célula). O aparelho pode adicionalmente compreender um classificador de célula 84 (por exemplo, placas eletrostáticas e receptáculos; ou, particularmente em sistemas microfluídicos, comutadores óticos, micro-bomba(s) eletrosmótica(s) de campo livre rápida(s), ou classificadores de transferência de momento, e canais de classificação) tipicamente estabelecidos de fluxo descendente de um local da iluminação de célula. O sistema de análise de dados eletrônico pode ser configurado para operar em leituras (por exemplo, leituras de intensidade de luz) a partir dos detectores de modo a determinar se informação segura relativa a uma característica de célula intrínseca pode ser recolhida destas, talvez por processamento de tais leituras (por exemplo, comparações mútuas, comparações a valores predeterminados e/ou manipulando matematicamente tais leituras, se através do uso preferido de eletrônicos digitais, tais como circuito de processamento digital para processar pulsos de fotodetector de células proximalmente espaçadas ou não). Em pelo menos uma modalidade da tecnolo-

gia da invenção, o sistema de análise de dados eletrônico pode ser configurado para determinar se existe um par de detector (tipicamente, detectores em um par serão mutuamente ortogonais) em que uma das leituras de detector é substancialmente duas vezes a outra leitura; conforme é bem conhecido, quando tal é o caso, a leitura inferior pode ser confiada em determinar precisamente informação relativa a uma característica de célula intrínseca.

Adicionalmente, o projetor de radiação eletromagnética 15 pode ser estabelecido para efetuar iluminação de célula por projeção de radiação eletromagnética nas células e em uma direção substancialmente paralela à linha de alinhamento de eixo curto da seção transversal de célula de fluxo ortogonal 13 (embora, de fato, o projetor de EMR não possa ser assim estabelecido). É também de notar que, em certas modalidades, o aparelho de tecnologia de detector de eixo externo pode ser operacional após um procedimento de retroassentamento ser realizado, talvez em um citômetro de fluxo que não tem um terceiro e um quarto detector de EMR associado com uma iluminação simples (dois aparelhos de detector), conforme mencionado acima.

Conforme mencionado, um aspecto da tecnologia da invenção que pode ser particularmente relacionado à tecnologia de detector de eixo externo pode ser descrito como método de retroassentamento de citômetro de fluxo. Ele pode incluir, entre outros, a etapa inicial de segurar um citômetro de fluxo para um procedimento de retroassentamento; cujo citômetro de célula pode ser os dois aparelhos de detector de célula orientada descritos acima. A etapa de segurar o citômetro de fluxo pode compreender a etapa de prender o citômetro de fluxo e/ou a etapa de simplesmente estabelecer o citômetro de fluxo antes de um retroassentador (por exemplo, um técnico capaz de realizar um retroassentamento bem sucedido).

O método de retroassentamento de citômetro de fluxo antes mencionado pode adicionalmente compreender as etapas de estabelecer (por exemplo, por "assentamento" mecanicamente e eletricamente) um terceiro detector de EMR 23 e um quarto detector de EMR 24 para cada um

detectar EMR emitida como um resultado da iluminação de célula. O terceiro detector de EMR 23 pode ter um ângulo de coleta de fluxo ortogonal do terceiro detector 33 que define um eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal 43 e o quarto detector de EMR 24 pode ter um ângulo de coleta de fluxo ortogonal do quarto detector 34 que define um eixo do quarto detector de fluxo ortogonal 44. A etapa de estabelecimento de um terceiro detector de EMR 23 e o quarto detector de EMR 24 pode compreender a etapa de estabelecimento do terceiro detector de EMR 23 e o quarto detector de EMR 24 de modo que: o eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal 43 e o eixo do quarto detector de fluxo ortogonal 44 são substancialmente 90 graus espaçados, e o eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal 43 é de 30 graus a 60 graus (por exemplo, aproximadamente 45 graus, onde aproximadamente conforme aqui usado indica dentro de 3 graus ou fora do(s) número(s) indicado(s) a partir da linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida 13.

É de notar que qualquer aparelho que reflete ou a tecnologia de detector de eixo externo ou a tecnologia de iluminação espaçada axialmente (ver abaixo) podem incluir óticos controlavelmente móveis (por exemplo, óticos motorizados). Em tais modalidades, ou o(s) projetor(es) de EMR e/ou os detectores podem ser controlavelmente movidos para posições desejadas (por exemplo, os ângulos relativos de dois ou mais dos eixos de detector de fluxo ortogonal podem ser ajustados após movimento via controle motorizado 90 (se computador controlado ou, de outro modo)). De fato, qualquer tipo de ajuste (deslocamento de um detector (por exemplo, sua lente e ou PMT) ao longo ou ao redor de um eixo de fluxo de posicionamento radial de um projetor de EMR dentro de um plano de fluxo ortogonal, conforme, mas com poucos exemplos), talvez para aperfeiçoar análise, pode ser efetuado via controle motorizado, que pode incluir controle eletrônico e um trilho, em uma das várias configurações possíveis.

Um aspecto independente, mas não obstante relacionado, da tecnologia da invenção pode ser referido como focalizando uma "iluminação espaçada axialmente" (onde "axialmente" se refere ao eixo de fluxo) e pode

ser descrito como um aparelho de análise de célula que compreende uma fonte de célula 1 que inclui uma pluralidade de células a ser analisadas, um canal 4 que define um eixo de fluxo 8 e através do qual as células escoam em uma direção de fluxo descendente (que pode, mas não necessita ser uma direção gravitacional para baixo); um primeiro projetor de radiação eletromagnética 101 definindo um eixo do primeiro projetor de fluxo ortogonal 111 e estabelecido para efetuar uma primeira iluminação de célula por projeção da radiação eletromagnética nas células em um primeiro local de iluminação 121; pelo menos um primeiro detector de iluminação de EMR 141 estabelecido de modo a detectar EMR emitida como um resultado da primeira iluminação de célula; um segundo projetor de radiação eletromagnética 102 definindo um eixo do segundo projetor de fluxo ortogonal 112 e estabelecido para efetuar uma segunda iluminação de célula por projeção de radiação eletromagnética nas células em um segundo local de iluminação 122; e pelo menos um segundo detector de iluminação de EMR estabelecido 151 de modo a detectar EMR emitida como um resultado da segunda iluminação de célula, onde a segunda localização de iluminação é de fluxo descendente da primeira localização de iluminação, e onde o primeiro eixo de projetor de fluxo ortogonal 111 e o eixo do segundo projetor de fluxo ortogonal (quando tais eixos são sobrepostos) definem um ângulo diferente de zero 180 (por exemplo, aproximadamente 45 graus, aproximadamente 90 graus, ou dentro das faixas (incluindo pontos finais) de 44 graus a 50 graus, 40 graus a 45 graus, 38 graus a 43 graus, e de 34 a 41 graus, conforme, mas um pouco de muitas possibilidades). É de notar que um eixo de projetor de fluxo ortogonal é a projeção, em um plano de fluxo ortogonal 50, do eixo central do EMR (se na forma de um feixe ou, de outro modo) projetada por um projetor de radiação eletromagnética; de tal maneira, um projetor de radiação eletromagnética define o eixo de projetor de fluxo ortogonal.

Naturalmente, podem existir mais do que duas iluminações axialmente espaçadas, tipicamente efetuadas por mais do que dois projetores de EMR, cada um definindo um respectivo eixo de projetor de fluxo ortogonal. Tais eixos tipicamente não se sobreporiam. Uma modalidade preferida

pode envolver uma quarta configuração de iluminação com cada projetor definindo um eixo que está a 45 graus a um eixo de projetor mais próximo. Isto pode se originar da observação em algumas aplicações e usando-se alguns citômetros, cuja iluminação se torna inefetiva quando o eixo do projetor define um ângulo maior do que cerca de 50 graus com o eixo curto de seção transversal de célula de fluxo ortogonal. Contudo, esta não é a única configuração possível, conforme de fato, três, cinco, seis, sete sistemas de projetor ascendentes, com vários ângulos definidos pelos eixos do projetor, são possíveis e contemplados pela tecnologia da invenção. Em certos desenhos, um sistema projetor "n" terá "n" projetores definindo "n" eixos, onde cada eixo está a aproximadamente  $180/n$  graus de um eixo mais próximo.

Em modalidades particulares do aparelho de "iluminação espaçada axialmente", o pelo menos um primeiro detector de iluminação de EMR 141 pode compreender dois primeiros detectores de iluminação de EMR. Adicionalmente, o canal pode formar pelo menos parte de uma trajetória de fluxo de orientação, e os dois primeiros detectores de iluminação de EMR podem ter ângulos de coleta que definem eixos do primeiro detector de iluminação de fluxo ortogonal. Tais eixos podem ser mutualmente ortogonais. Também, é de notar que o canal 4 pode definir uma linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida 13, e um dos eixos do primeiro detector de iluminação de fluxo ortogonal pode ser alinhado com a linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (particularmente onde o eixo do primeiro projetor de fluxo ortogonal é paralelo com a linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida).

Em modalidades particulares do aparelho de "iluminação espaçada axialmente", o pelo menos um segundo detector de iluminação de EMR 151 pode compreender dois segundos detectores de iluminação de EMR (como tal, dois detectores de EMR podem detectar iluminação emitida como um resultado da segunda iluminação), e o canal pode formar pelo menos parte de uma trajetória de fluxo de orientação. Adicionalmente, os dois segundos detectores de iluminação de EMR podem ter ângulos de coleta que

definem eixos do segundo detector de iluminação de fluxo ortogonal; tais eixos pode ser mutuamente ortogonais. O canal pode definir uma linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal 13, e um dos eixos do segundo detector de iluminação de fluxo ortogonal  
5 pode ser de 30 graus a 60 graus a partir da linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (particularmente onde o eixo do segundo projetor de fluxo ortogonal é de 30 a 60 graus da linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida).

10 Em pelo menos uma modalidade do aparelho de "iluminação espaçada axialmente" da invenção, o pelo menos um primeiro detector de iluminação pode compreender pelo menos três primeiros detectores de iluminação. Pelo menos um dos pelo menos três primeiros detectores de iluminação pode coletar EMR que se desloca em uma direção que não é ortogonal  
15 ao fluxo. Adicionalmente, o pelo menos um segundo detector de iluminação pode compreender pelo menos três segundos detectores de iluminação, e pelo menos um dos pelo menos três segundos detectores de iluminação pode coletar EMR que se desloca em uma direção que não é ortogonal ao fluxo.

20 Cada iluminação espaçada axialmente (e a composição de detector associada com este) pode caracterizar qualquer dos aspectos da tecnologia de detector de eixo externo antes mencionada, particularmente, naturalmente, onde o canal procura orientar as células (por exemplo, no caso de um bocal de orientação). Como tal, cada local de iluminação pode ter associado com este, em uma modalidade exemplar, quatro detectores (conforme descrito acima relativo à tecnologia de detector de eixo externo). Relativo aos detectores associados com outro fluxo ascendente imediatamente, ou local de iluminação de fluxo ascendente, os detectores de um local de  
25 iluminação de referência podem ser dispostos em um ângulo (conforme projetado em um plano de fluxo ortogonal) que imita a disposição angular relativa (também conforme projetado em um plano de fluxo ortogonal) dos projetores de EMR correspondentes. Como tal, onde um eixo do primeiro projetor  
30

de fluxo ortogonal 111 e um eixo do segundo projetor de fluxo ortogonal 121 define um ângulo de 45 graus, os eixos do primeiro detector de iluminação de fluxo ortogonal podem cada formar um ângulo de 45 graus com cada eixos do segundo detector de iluminação de fluxo ortogonal correspondente, particularmente onde cada um dos conjuntos de detectores têm a mesma configuração relativa a seus respectivos projetores de EMR. Naturalmente, esta é somente uma de quaisquer configurações possíveis (algumas dos quais não podem exibir tal desenho de "imitação de ângulo").

É de notar que pelo menos um dos pelo menos um primeiro detector de iluminação 141 e o pelo menos um segundo detector de iluminação 151 pode coletar EMR que se desloca em um plano de fluxo ortogonal (embora isto não seja certamente um requerimento). Adicionalmente, pelo menos um dos pelo menos um primeiro detector de iluminação 141 e o pelo menos um segundo detector de iluminação 151 podem coletar EMR que se desloca em uma direção que não é ortogonal ao fluxo.

Como com qualquer projetor de EMR em qualquer das tecnologias da invenção, o primeiro projetor de EMR 101 pode compreender uma primeira fonte de EMR e o segundo projetor de EMR compreende uma segunda fonte de EMR (por exemplo, laser, uma lâmpada de arco e um LED). Conforme deve ser compreendido, um projetor de EMR é um objeto ou dispositivo que projeta EMR. Como tal, pode ser um refletor tal como um espelho, ou uma fonte de EMR.

Em modalidades particulares de "iluminação espaçada axialmente", a primeira iluminação e a segunda iluminação podem ocorrer quando a célula está no canal (por exemplo, em aplicações microfluídicas); em outras (como onde o aparelho de análise de célula é um citômetro de fluxo de jato em ar), a primeira iluminação e a segunda iluminação ocorrem após a célula ter saído do canal. Adicionalmente, em certas modalidades, a segunda iluminação de célula (e quaisquer outras iluminações de fluxo descendente) pode ser impedida em resposta a informação derivada de leituras do pelo menos um primeiro detector de iluminação de EMR; como se pode esperar, tal segunda (e/ou terceira, ou quarta) iluminação pode ser corretamente im-

pedida quando uma iluminação de fluxo imediatamente ascendente (por exemplo, a segundo iluminação seria de fluxo imediatamente ascendente de uma terceira iluminação) resulta em leituras de detector seguras (por exemplo, onde a leitura de intensidade do primeiro detector é duas vezes aquela do segundo detector). Naturalmente, pode ser o caso onde a iluminação mais precoce (por exemplo, de fluxo mais ascendente) para produzir resultados seguros pode ser de fluxo descendente da primeira iluminação (o fluxo mais ascendente); em tal caso, conforme esperado, somente aquelas iluminações que são adicionalmente de fluxo descendente da iluminação mais precoce produzindo resultados seguros podem ser impedidas. Por exemplo, onde existem quatro locais de iluminação (um termo que deve ser compreendido requer somente a capacidade de iluminar em tais locais), onde a terceira iluminação é a mais precoce para produzir leituras de detector seguras, pode ser possível impedir somente a quarta iluminação. Naturalmente, o fundamento lógico para limitação da iluminação é para moderar, ou evitar totalmente, impactos de viabilidade/saúde/eficiência de célula nociva possivelmente indesejados atribuídos a quantidades excessivas de radiação.

É também de se notar que o aparelho de "iluminação espaçada axialmente" pode adicionalmente compreender uma fonte de célula 1 que inclui uma pluralidade de células a ser analisadas, um sistema de análise de dados eletrônico 82 ao qual leituras de pelo menos um dos detectores de EMR são admitidas, e um classificador de célula 84 estabelecido de fluxo descendente do segundo local de iluminação de célula 122 (que inclui um desenho onde, por exemplo, o local de iluminação que é mais próximo ao classificador de célula é um terceiro local de iluminação).

Importantemente, e conforme mencionado, a tecnologia de "iluminação espaçada axialmente" pode incorporar uma ou mais características da "tecnologia de detector de eixo externo". Contudo, é importante compreender que um aparelho concretizando a tecnologia de "iluminação espaçada axialmente" não necessita orientar radialmente as células em qualquer modo (embora, de fato, as células possam ser orientadas de modo que seu eixo longo seja paralelo ao eixo de fluxo). Em tais aplicações não orientadas, ig-

norando-se interesses relativos à sobre-irradiação de células, quatro projetores de EMR axialmente espaçados, cada um emitindo projetor de EMR tendo um eixo de projetor de fluxo ortogonal que é aproximadamente 45 graus de um eixo de projetor de fluxo ortogonal mais próximo, podem ser preferíveis. É de se notar que as figuras 14-20 mostram somente um pouco das muitas modalidades possíveis; outras modalidades incluem, mas não são limitadas a, aquelas modalidades onde um ou mais dos projetores de EMR são estabelecidos 180 graus de onde é mostrado em tais figuras.

É também de notar que, embora a tecnologia de "detector de eixo externo" da invenção possa, de fato, encontrar aplicação em aparelho concretizando tecnologias microfluídicas, são as tecnologias de "iluminação espaçada axialmente" da invenção que podem encontrar uma aplicação microfluídica mais pronunciada do que pode a tecnologia de detector de eixo externo. Como tal, o termo canal, conforme aqui usado, inclui, mas não é limitado a, uma extremidade de bocal de orientação ou um canal microfluídico.

É de notar que em qualquer das modalidades, as células analisadas podem ser células de esperma (se animal não humano, tal como esperma de touro, ou outro), ou, de fato, qualquer de um número de tipos de células esféricas. Adicionalmente, em quaisquer modalidades de "detector de eixo externo" ou "iluminação espaçada axialmente" (novamente, alguns aparelhos podem concretizar ambas as tecnologias, o aparelho conforme reivindicado pode ser um de vários tais aparelhos em um dispositivo de classificação paralelo (se tal dispositivo é microfluídico ou à base de citômetro convencional).

Um método que se relaciona diretamente a "iluminação espaçada axialmente" pode ser referido como um método de análise de célula e pode compreender as etapas de: estabelecimento de uma fonte de célula que inclui uma pluralidade de células a serem analisadas, passando as células através de um canal que define um eixo de fluxo e em uma direção de fluxo descendente; estabelecimento de um primeiro projetor de radiação eletromagnética de modo a efetuar uma primeira iluminação de célula por pro-

jeção de radiação eletromagnética nas células em um primeiro local de iluminação 121, no qual o primeiro projetor de radiação eletromagnética define um eixo do primeiro projetor de fluxo ortogonal 111; estabelecimento de pelo menos um primeiro detector de iluminação de EMR 141 de modo a detectar  
5 EMR emitida como um resultado da primeira iluminação de célula; estabelecimento de um segundo projetor de radiação eletromagnética 102 de modo a efetuar uma segunda iluminação de célula por projeção da radiação eletromagnética nas células em um segundo local de iluminação 122, no qual o  
10 segundo projetor de radiação eletromagnética define um segundo eixo de projetor de fluxo ortogonal 112, estabelecimento de pelo menos um segundo detector de iluminação de EMR 151 de modo a detectar EMR emitida como um resultado da segunda iluminação de célula, no qual a segunda localização de iluminação é de fluxo descendente da primeira localização de iluminação, e no qual o eixo do primeiro projetor de fluxo ortogonal e o eixo do  
15 segundo projetor de fluxo ortogonal definem um ângulo diferente de zero 180. Etapas adicionais podem se relacionar ao estabelecimento de um terceiro projetor de radiação eletromagnética 103 de modo a efetuar uma terceira iluminação de célula por projeção de radiação eletromagnética nas células em um terceiro local de iluminação 123 que é de fluxo descendente do  
20 segundo local de iluminação 112. Naturalmente, outras características desta tecnologia de método da invenção podem ser conforme descrito acima relativas ao aparelho de "iluminação espaçada axialmente".

Modalidades particulares da tecnologia da invenção podem ser descritas como um aparelho de análise de célula (por exemplo, um citômetro  
25 de fluxo ou um aparelho à base de microfluídico) que compreende um canal de orientação radial 5 e/ou 6 que orienta radialmente uma célula que passa através, e que define uma linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida 13; um projetor de EMR 15 que projeta EMR na referido célula para efetuar uma iluminação de célula;  
30 la; uma configuração de detector de EMR que inclui uma pluralidade de detectores de EMR 21, 22 (e outros talvez) capazes de detectar EMR emitida como um resultado de referida iluminação de célula e que é capaz de gerar

uma leitura de EMR detectada segura; e um sistema de análise eletrônico 82 que usa referida leitura de EMR detectada segura para gerar informação precisa sobre uma característica de célula intrínseca, no qual referida configuração de detector de EMR é capaz de obter tal leitura de EMR detectada

5 segura quando um eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal 11 e referida linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida 13 formam um ângulo que é de zero a 45 graus. Citômetros de fluxo convencionais simplesmente não podem ser capazes de analisar precisamente células que são "desorientadas" (radial-

10 mente) a uma tal extensão. Tal aparelho da invenção pode usar um esquema e elementos descritos na tecnologia de detector de eixo externo". Aparelho empregando aspectos da tecnologia de "iluminação espaçada axialmente", talvez incorporando características da "tecnologia de detector de eixo externo de célula orientada", pode ser capaz de analisar precisamente uma

15 célula quando o eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal e a linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida formam um ângulo que é de 0 a 90 graus (por exemplo, onde os eixos do projetor de fluxo ortogonal de dois projetores de EMR definem um ângulo de 45 graus, e dois conjuntos de detectores com

20 eixos mutuamente ortogonais, onde um eixo de detector de um conjunto é alinhado com um eixo de projetor, e um eixo de detector do outro conjunto é alinhado com o outro eixo de projetor). Com projetores o bastante, conforme explanado acima, corretamente orientados, e com detectores de EMR configurados em coordenação com estes, conforme também explanado, orientação radial pode ser irrelevante no problema de análise. É de se notar que, indiferente do foco específico da tecnologia da invenção, pode-se incluir um mamífero nascido (nato) após uma inseminação com uma célula de esperma classificada usando-se o aparelho de, ou de acordo com o método de qualquer das várias modalidades da tecnologia da invenção.

30 Conforme pode ser facilmente compreendido a partir do precedente, os conceitos básicos da presente invenção podem ser concretizados em uma variedade de modos. Ela envolve ambas as técnicas de análise de

partícula, bem como dispositivos para efetuar a análise apropriada. Nesta aplicação, as técnicas de análise de partícula são reveladas como parte dos resultados mostrados a ser alcançados pelos vários dispositivos descritos e como etapas que são inerentes a utilização. Eles são simplesmente o resultado natural da utilização dos dispositivos conforme pretendido e descrito. Em adição, enquanto alguns dispositivos são revelados, deve ser compreendido que estes não somente efetuam certos métodos, mas também podem ser variados em um número de modos. Importantemente, como para todos dos precedentes, todas estas facetas devem ser compreendidas para serem envolvidas por esta revelação.

O leitor deve estar ciente que a discussão específica não pode explicitamente descrever todas as modalidades possíveis; muitas alternativas são implícitas. Também se pode não totalmente explicar a natureza genérica da invenção e não se pode explicitamente mostrar como cada característica ou elemento pode atualmente ser representativa de uma função mais ampla ou de uma grande variedade de elementos alternativos ou equivalentes. Novamente, estes são implicitamente incluídos nesta descrição. Onde a invenção é descrita em terminologia orientada por dispositivo, cada elemento do dispositivo realiza implicitamente uma função. As reivindicações do aparelho podem não somente serem incluídas para o dispositivo descrito, mas também reivindicações de método ou processo podem ser incluídas para dirigirem-se a funções da invenção e cada elemento que realiza. Nem a descrição nem a terminologia são pretendidas para limitar o escopo das reivindicações que serão incluídas em qualquer pedido de patente subsequente.

Deve também ser compreendido que uma variedade de mudanças podem ser feitas sem fugir da essência da invenção. Tais mudanças são também implicitamente incluídas na descrição. Elas ainda caem dentro do escopo desta invenção. Uma revelação ampla envolvendo ambas a(s) modalidade(s) explícita(s) mostrada(s), a grande variedade de modalidades alternativas implícitas, e os métodos ou processos amplos e similares, são envolvidos por esta revelação, e podem ser confiadas quando se esboça as

reivindicações para qualquer pedido de patente subsequente. Deve ser compreendido que tais mudanças de linguagem e reivindicação mais ampla ou mais detalhada podem ser efetuadas em uma data posterior (tal como por qualquer prazo requerido), ou no caso do pedido subsequentemente procura  
5 um depósito de patente baseado neste depósito. Com esta compreensão, o leitor deve estar ciente que esta revelação é para ser compreendida para suportar qualquer pedido de patente subsequentemente depositado que possa procurar exame de quão ampla uma base de reivindicações conforme considerado dentro do direito da requerente e pode ser designada para pro-  
10 duzir uma patente que cubra numerosos aspectos da invenção ambos independentemente e como um sistema total.

Adicionalmente, cada um dos vários elementos da invenção e reivindicações pode também ser alcançado em uma variedade de maneiras. Adicionalmente, quando usado ou implicado, um elemento é para ser com-  
15 preendido como envolvendo estruturas individuais, bem como plurais que podem ou não podem estar fisicamente ligados. Esta revelação deve ser compreendida para envolver cada tal variação, seja ela uma variação de uma modalidade de qualquer modalidade de aparelho, uma modalidade de método ou processo, ou ainda meramente uma variação de qualquer ele-  
20 mento destes. Particularmente, deve ser compreendido que revelação se refere a elementos da invenção, as palavras para cada elemento podem ser expressas por termos de aparelho equivalentes ou termos de método — mesmo se somente a função ou resultado é o mesmo. Tal equivalente, mais amplo, ou ainda termos mais genéricos devem ser considerados envolvidos na descrição de cada elemento ou ação. Tais termos podem ser substituídos  
25 onde desejado para tornar explícita a cobertura implicitamente ampla a qual esta invenção é intitulada. Como um exemplo, deve ser compreendido que todas as ações podem ser expressas como um meio para tomar esta ação, ou como um elemento que causa esta ação. Similarmente, cada elemento  
30 físico revelado deve ser compreendido envolver uma descrição da ação que este elemento físico facilita. Com relação a este último aspecto, como um exemplo, a descrição de um "classificador" deve ser compreendida envolver

a descrição do ato de "classificação" — se explicitamente discutido ou não — e, inversamente, existem descrição efetivamente do ato de "classificação", tal como uma descrição deve ser compreendida envolver descrição de um "classificador" e ainda um "meio para classificação". Tais mudanças e termos alternativos são para serem compreendidos para serem explicitamente incluídos na descrição.

Quaisquer atos de lei, estatutos, regulações ou regras mencionadas neste pedido de patente, ou patentes, publicações, ou outras referências mencionadas neste pedido de patente são, desse modo, incorporados por referência. Qualquer caso(s) de prioridade reivindicada por este pedido é, desse modo, anexado e, desse modo, incorporado por referência, como são quaisquer Exibições. Em adição, como para cada termo usado, deve ser compreendido que, a menos que sua utilização neste pedido seja inconsistente com uma interpretação amplamente suportada, definições de dicionário comuns devem ser compreendidas como incorporadas para cada termo e todas as definições, termos alternativos e sinônimos, tais como contidos no *Random House Webster's Unabridged Dictionary*, segunda edição, são, desse modo, incorporados por referência. Finalmente, todas as referências listadas na lista de Referências A Serem Incorporadas Por Referência De Acordo Com O Pedido de Patente, ou outra declaração de informação depositada com o pedido são, desse modo, anexados e, desse modo, incorporados por referência, contudo, como para cada do acima, para a extensão que tal informação ou declarações incorporadas por referência podem ser consideradas inconsistentes com o patenteamento desta(s) invenção(ões), tais declarações são expressamente para não serem consideradas como produzidas pela(s) requerente(s).

## I. Documentos de Patente dos Estados Unidos

NÚMERO DE DOCUMENTO E TIPO DE CÓDIGO (SE CONHECIDO)	DATA E PUB MM-DD-AAAA	Patente ou Nome do Requerente
3299354	12/17/1967	Hogg
3547526	12/15/1970	Deveraux
3661460	05/09/1972	Elking et al.
3710933	01/16/1973	Fulwyler et al.
3761941	09/25/1973	Robertson
3810010	05/07/1974	Thom
3826364	07/30/1974	Donner et al.
3833796	11/03/1974	Fetner et al.
3909744	09/30/1975	Wisner et al.
3947093	03/30/1976	Goshima et al.
3960449	07/01/1976	Carleton et al.
3963606	06/15/1976	Hogg
3973196	08/03/1976	Hogg
4014611	03/29/1977	Simpson et al.
4070617	01/24/1978	Kachel et al.
4162282	07/24/1979	Fulwyler et al.
4179218	12/18/1979	Erdmann et al.
4200802	04/29/1980	Saleman et al.
4230558	10/28/1980	Fulwyler
4255021	03/10/1981	Brandsen
4274740	06/23/1981	Eidenschink et al.
4302166	11/24/1981	Fulwyler et al.
4317520	03/02/1982	Lombardo et al.
4318480	03/09/1982	Lombardo et al.
4318481	03/09/1982	Lombardo et al.
4318482	03/09/1982	Barry et al.

4318483	03/09/1982	Lombardo et al.
4325483	04/20/1982	Lombardo et al.
4341471	07/27/1982	Hogg et al.
4350410	09/21/1982	Minott
4361400	11/30/1982	Gray et al
4395676	07/26/1983	Hollinger et al.
4400764	08/23/1983	Kenyon
4422761	12/27/1983	Frommer
4487320	12/11/1984	Auer
4498766	02/12/1985	Unterleitner
4515274	05/07/1985	Hollinger et al.
4523809	06/18/1985	Tobocada et al.
4538733	11/03/1985	Hoffman
4598408	07/01/1986	O'Keefe
4600302	07/15/1986	Sage, Jr.
4631483	12/23/1986	Proni et al.
4637691	01/20/1987	Uehara et al.
4673288	06/16/1987	Thomas et al.
4691829	09/08/1987	Auer
4702598	10/27/1987	Böhmer
4744090	03/10/1988	Freiberg
4758729	07/19/1988	Monnin
4794086	01/27/1988	Kasper et al.
4818103	04/04/1989	Thomas et al.
4831385	05/16/1989	Archer et al.
4845025	07/04/1989	Lary et al
4942305	07/17/1990	Sommer
4981580	01/01/1991	Auer
4983038	01/08/1991	Ohki et al.

5005981	04/09/1991	Schults et al.
5007732	04/16/1991	Obiki et al.
5030002	07/09/1991	North, Jr.
5079959	01/14/1992	Miyake et al.
5098657	03/24/1992	Blackford et al.
5101973	04/07/1992	Marcus
5127729	07/07/1992	Oetliker et al.
5132548	07/21/1992	Borden et al.
5144224	09/01/1992	Larsen
5150313	09/22/1992	Vun den Engh et al.
5159397	10/27/1992	Kosaka et al.
5159403	10/27/1992	Kosaka
5167925	12/01/1992	Kimura et al.
5180065	01/19/1993	Touge et al.
5182617	01/26/1993	Yonoyama et al.
5199575	04/06/1993	Corio et al.
5215375	06/01/1993	Schulte et al.
5247339	09/21/1993	Ogino
5259593	11/09/1993	Orme et al.
5260764	11/09/1993	Fukuda et al.
5298967	03/29/1994	Wells
5359907	11/01/1994	Baker et al.
5370842	12/06/1994	Miyazaki et al.
5412465	05/02/1995	Ogino
5452054	09/19/1995	Dewa et al.
5466572	11/14/1995	Sasaki, et al.
5467189	11/14/1995	Kreikbaum et al.
5471299	11/28/1995	Kaye et al.
5483469	01/09/1996	Vun den Engh et al.

5558998	09/24/1996	Hammond, et al.
5596401	01/21/1997	Kusuzawa
5601235	02/11/1997	Booker et al
5602349	02/11/1997	Van den Engh
5641457	07/24/1997	Vardanega, et al.
5643796	07/01/1997	Van den Engh et al.
5650847	07/22/1997	Maltsev et al.
5675401	10/07/1997	Wangler et al.
5684575	11/04/1997	Steen
5700692	12/23/1997	Sweet
5707808	01/13/1998	Rostaniec et al.
5708868	01/13/1998	Ishikawa
6819411	11/16/2004	Sharpe et al.

## II. Documentos de Patente Estrangeiros

Código do País do Documento da Patente Estrangeira	Data e número PUB MM-DD-AA	Patente ou nome da Requerente
EP0160201A2	11/06/1985	Becton, Dickinson & Company
EP025296A2	03/18/1981	Ortho Diagnostic Systems Inc.
EP0468100A1	01/29/1992	TOA Medical Electronics Co., Ltd.
FR2699678-A1	12/23/1992	Union Stes Coup Agricoles
JP2024535	01/26/1990	Canon Inc.
JP4126064 (A)	27/04/1992	Nitto Shokai:KK Shiomi Atsushi
JP4126065 (A)	04/27/1992	Okonogi Saburo
JP4126066 (A)	04/27/1992	PCC Technol:KK
JP4126079 (A)	04/27/1992	Daiwa Kasei KK
JP4126080 (A)	04/27/1992	Ukada Juzo Nippon Shokuhin Kako Co Ltd
JP4126081 (A)	04/27/1992	PCC Technol:KK
JP61139747 (A)	06/27/1986	Canon Inc.
JP61139135 (A)	07/18/1986	Canon Inc.
SU1056008	11/23/1983	Stepanov Sergej, SU

SUI260778-A1	09/30/1996	TSNI Remgenc-Radiologičeskij Institut
WO 98/34194	02/02/1998	The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand
WO 2003020877 A2	8/15/2003	Pharmacia Corp. (c/o Monsanto Company)

### III. Documentos de Literatura de Não Patente

- Axicon; Journal of the Optical Society of America; Vol. 44, #8, Eastman Kodak Company, Hawk-Eye Works, Rochester, NY, 09/10/53, pp. 592-597
- 5 Celestron; Telescope Basics; [WWW.celestron.com/tb-2ref.htm](http://WWW.celestron.com/tb-2ref.htm); 4 pages
- Garner, D. L. et al; "Quantification of the X- e Y- Chromosome-Bearing Spermatozoa of Domestic Animals by Flow Cytometry<sup>1</sup>", Biology of Reproduction 28, pgs. 312-321, (1983)
- Gottlinger et al., "Operation of a flow cytometer", Flow Cytometry e Cell Sorting, A. Radbruch (Ed.), 1992, pp. 7-23
- 10 Johnson, Lawrence A., "Sex Preselection by Flow Cytometric Separation of X and Y Chromosome-bearing Sperm based on DNA Difference: a Review, Reprod. Fertil. Dev., 1995, 7, pgs. 893-903
- Melamed et al, "An Historical Review of the Development of Citômetro de fluxos and Sorters", 1979, pp. 3-9
- 15 Pinkel et al., "Flow Chambers e Sample Handling,", Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis, Van Dilla et al. (Eds.), 1985, pp. 77-128
- Sharpe, John C. et al., "A New Optical Configuration for Flow Cytometric sorting of Aspherical Células", Dept. of Physics e Electronic engineering, University of Waidato, Hamilton, New Zealand, Nov. 1997, pp. 334-341.
- 20 Sharpe, Johnathan, Thesis; "An Introduction of Flow Cytometry, " Chaptr. 2-2.2, 1997
- Sharpe, Johnathan, Thesis; "Gender Preselection-Principle Scientific Options," Chapter. 3.4-3.4.8, 1997
- 25 Sharpe, Johnathan, Thesis; "Sperm Sexing using Flow Cytometry," Chapter. 3.5-3.5.8, 1997
- Sharpe, Johnathan, Thesis; "Sperm Sexing-Method of Johnson et al," Chapter. 3.6- 4.3.4, 1997
- Sharpe, Johnathan, Advances in flow cytometry for sperm sexing, Unpublished paper, 2008
- 30

Skogen-Hagenson, M.J. et al; "A High Efficiency Flow Cytometer," The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 25, No. 7, pp. 784-789, 1977, USA

5 Van Dilla, Martin, "Overview of Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis", Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis, Van Dilla et al. (Eds.), 1985, pp. 1-8

Desse modo, a(s) requerente(s) deve(m) ser compreendido ter que suportar a reivindicação e fazer uma declaração de invenção para pelo menos: i) cada um dos dispositivos de análise conforme aqui revelado e descrito, ii) os métodos relacionados e descritos, iii) similar, equivalente e e ainda variações implícitas de cada um destes dispositivos e métodos, iv) aqueles desenhos alternativos que acompanham cada uma das funções mostradas conforme são reveladas e descritas, v) aqueles desenhos alternativos e métodos que acompanham cada uma das funções mostradas conforme são implícitas para acompanhar aquela que é revelada e descrita, vi) cada característica, componente e etapa mostrada como invenções separadas e independentes, vii) as aplicações intensificadas pelos vários sistemas ou componentes revelados, viii) os produtos resultantes produzidos por tais sistemas ou componentes, ix) vaada sistema, método e elemento mostrado  
10  
15  
20  
25  
ou descrito conforme agora aplicado a qualquer campo específico ou dispositivos mencionados, x) métodos e aparelhos substancialmente conforme descritos aqui antes e com referência a qualquer dos exemplos acompanhantes, xi) as várias combinações e permutações de cada um dos elementos revelados, xii) cada reivindicação potencialmente dependente ou conceito conforme uma dependência em cada e toda uma das reivindicações independentes ou conceitos apresentados, e xiii) todas as invenções aqui descritas.

Em adição e como para os aspectos de computador e cada aspecto receptivo para programação ou outra automação eletrônica, a(s) requerente (s) deve(m) ser compreendida(s) ter um suporte para reivindicação  
30  
e produzir uma declaração da invenção para pelo menos: xvi) processos realizados com o auxílio de ou em um computador conforme descrito através de

toda a discussão acima, xv) um aparelho programável conforme descrito através de toda a discussão acima, xvi) uma memória legível de computador codificada com dados para direcionar um computador compreendendo meios ou elementos que funcionem conforme descrito através de toda a discussão acima, xvii) um computador configurado conforme aqui revelado e descrito, xviii) sub-rotinas individuais ou combinadas e programas conforme aqui revelado e descrito, xix) os métodos relacionados revelados e descritos, xx) variações similares, equivalente e ainda implícitas de cada um destes sistemas e métodos, xxi) aqueles desenhos alternativos que acompanham cada uma das funções mostradas conforme são relevados e descritos, xxii) aqueles desenhos alternativos e métodos que acompanham cada uma das funções mostradas conforme são implícitas para acompanhar aquela que é revelada e descrita, xxiii) cada característica, componente e etapa conhecida como invenções separadas e independentes, e xxiv) as várias combinações e permutações de cada um dos acima.

Com relação às reivindicações se agora ou mais tarde apresentadas para exame, deve ser compreendido que por razões práticas e de modo a evitar grande expansão da carga de exame, a requerente pode, a qualquer momento, apresentar somente reivindicações iniciais ou talvez somente reivindicações iniciais com somente dependências iniciais. O escritório e quaisquer pessoas terceiras interessadas no escopo potencial deste ou pedidos subsequentes devem compreender que reivindicações mais amplas podem ser apresentadas em uma data posterior neste caso, em um caso reivindicando o benefício deste caso, ou em qualquer continuação apesar de quaisquer emendas preliminares, outras emendas, linguagem de reivindicação, ou argumentos apresentados, desse modo através de toda pendência de qualquer caso não existe intenção de desconsiderar ou renunciar a qualquer matéria objeto potencial. Deve ser compreendido que se ou quando reivindicações mais amplas forem apresentadas, pode-se requerer que qualquer técnica anterior relevante que pode ter sido considerada a qualquer tempo anterior pode necessitar ser revisitada, visto que é possível que para a extensão de quaisquer emendas, linguagem de reivindicação, ou argumen-

tos apresentados nesta ou qualquer pedido subsequente são considerados como produzidas para evitar tal técnica anterior, tais razões podem ser eliminadas pelas reivindicações apresentadas mais tarde ou similares. Ambos o examinador e qualquer pessoa de outro modo interessada na cobertura existente ou potencial posterior, ou considerando se existe a qualquer tempo qualquer possibilidade de uma indicação de desconsideração ou renúncia de cobertura potencial, deve estar ciente que nenhuma tal renúncia ou desconsideração é ainda pretendida ou ainda existe nesta ou qualquer pedido subsequente. Limitações tais como ocorridas em *Hakim v. Cannon Avent Group, PLC*, 479 F.3d 1313 (Fed. Cir 2007), ou similares, são expressamente não pretendidas neste ou qualquer matéria relacionada subsequente. Em adição, suporte deve ser compreendido para existir ao grau requerido sob as leis de matéria nova — incluindo, mas não limitada ao Artigo da Convenção de Patente Européia 123(2) e Lei de Patente dos Estados Unidos 35 USC 132, ou outras tais leis— para permitir a adição de qualquer das várias dependências ou outros elementos apresentados sob uma reivindicação independente ou conceito como dependências ou elementos sob qualquer outra reivindicação independente ou conceito. No esboço de quaisquer reivindicações em qualquer tempo se neste pedido ou em qualquer pedido subsequente, deve também ser compreendido que a requerente pretendeu capturar como total e amplo um escopo de cobertura conforme legalmente disponível. Para a extensão que substituintes não substanciais são feitos, para a extensão que a requerente não de fato esboça qualquer reivindicação de modo a envolver literalmente qualquer modalidade particular, e para a extensão, de outro modo, aplicável, a requerente não deve ser compreendida ter, de qualquer modo, pretendido ou atualmente abandonar tal cobertura conforme a requerente não pode simplesmente ter sido capaz de antecipar todas as eventualidades; um versado na técnica não deve ser razoavelmente esperado ter esboçado uma reivindicação que teria literalmente envolvido tais modalidades alternativas.

Adicionalmente, se ou quando usado, o uso da frase transicional "compreendendo" é usada para manter as reivindicações de "extremidade

aberta" aqui, de acordo com a interpretação de reivindicação tradicional. Desse modo, a menos que o contexto requeira de outro modo, deve ser compreendido que o termo "compreende" ou variações tais como "compreende" ou "compreendendo", são pretendidas para implicar na inclusão de um elemento citado ou etapa ou grupo de elementos ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro elemento ou etapa ou grupo de elementos ou etapas. Tais termos devem ser interpretados em sua forma mais expansiva de modo a proporcionar a requerente à cobertura mais ampla legalmente permitível. O uso da frase, "ou qualquer outra reivindicação" é usado para proporcionar suporte para qualquer reivindicação a ser dependente de qualquer outra reivindicação, tal como outra reivindicação dependente, outra reivindicação independente, uma reivindicação anteriormente listada, uma reivindicação subsequentemente listada, e similares. Como um exemplo de esclarecimento, se uma reivindicação era dependente "da reivindicação 20 ou qualquer outra reivindicação" ou similar, ela pode ser reesboçada como dependente da reivindicação 1, reivindicação 15, ou ainda reivindicação 715 (se tal existisse) se desejado, e ainda cai com a descrição. Deve ser compreendido que esta frase também proporciona suporte para qualquer combinação de elementos nas reivindicações e ainda incorpora qualquer base antecedente correta desejada para certas combinações de reivindicação, tais como com combinações de método, aparelho, processo, e as reivindicações similares.

Finalmente, quaisquer reivindicações colocadas em qualquer tempo são desse modo, incorporadas por referência como parte desta descrição da invenção, e a requerente reserva expressamente o direito de usar todo ou uma porção de tal conteúdo incorporado de tais reivindicações como descrição adicional para suportar qualquer de, ou todas das reivindicações ou qualquer elemento ou componente destas, e a requerente adicionalmente reserva expressamente o direito de mover qualquer porção de ou todo do conteúdo incorporado de tais reivindicações ou qualquer elemento ou componente destas a partir da descrição nas reivindicações ou vice-versa conforme necessário para definir a matéria para qual proteção é pretendida por

este pedido ou por qualquer continuação subsequente, divisão ou continuação em parte deste, ou para obter qualquer benefício de redução em taxas de acordo com, ou para cumprir com as leis de patente, regras ou regulações de qualquer país ou tratado, e tal conteúdo incorporado por referência  
5 deve persistir durante a pendência total deste pedido incluindo qualquer continuação subsequente, divisão ou continuação em parte deste ou qualquer republicação ou extensão.

A seguinte Exibição que aparece daqui para o início das reivindicações se refere mais diretamente aos experimentos realizados em conjunto  
10 com a tecnologia da invenção. Na interpretação das reivindicações, é o texto acima - e não o texto da Exibição abaixo – que controla. Na mesma tendência, qualquer linguagem de restrição na Exibição que pode parecer indicar que a invenção por necessidade deve incluir certas características não é para limitar as reivindicações em qualquer modo. Adicionalmente, as referências citadas no final da Exibição são incorporadas aqui.  
15

#### EXIBIÇÃO 1 – RESULTADOS DE TESTE EXPERIMENTAIS

##### RESUMO (Exibição 1)

Antecedente: Classificação de citometria de fluxo de cromossomos X e Y suportando esperma para pré-seleção de gênero em mamíferos  
20 yem recentemente progredido para aplicação industrial. Contudo, a precisão, produção e eficiência desta técnica para medição e classificação de células é altamente dependente em orientação fluídica efetiva das cabeças de esperma planas relativas à fonte de excitação e fotodetectores. Métodos: Neste relatório, um novo sistema óptico de quad-detector é apresentado para  
25 eficiência aperfeiçoada e tipo de produção. O desenho deste sistema foi aumentado e otimizado com estudos óticos nas células de esperma através de simulações (modelo de Monte Carlo de fluorescência direcional ao redor de uma cabeça de esperma) e resultados experimentais de estudos de ângulo de excitação. Resultados: O sistema de quad-detector proporciona um aumento nas células de esperma X vivas que pode ser precisamente medido e  
30 classificado para teor de DNA a partir da corrente 34% para mais de 40% (de uma taxa de classificação média de 6000 a mais de 7000 células seg<sup>-1</sup>),

em taxas de evento de admissão excedendo 35.000 células seg<sup>11</sup>. É verificado que este aperfeiçoamento na eficiência de orientação pode ser alcançado sem a necessidade de trajetórias de laser adicionais ou modificações fluídicas sobre sistemas existentes e sem comprometer a pureza de classificação. Conclusões: O sistema ótico de quad-detector proporciona uma trajetória potencial para taxas de produção aumentadas e desperdício de amostra reduzido de células não orientadas para análise de esperma e classificação onde amostras são custosas ou preciosas, tais como em geração doméstica e espécies ameaçadas, ou em outras medições de partícula esférica.

## 10 INTRODUÇÃO (Exibição 1)

O espermatozoário de muitas espécies de mamífero contém ou um cromossomo de DNA X ou Y pertencente à informação genérica para o gênero de uma descendência quando um ovo é fertilizado. Pelo mancha-mento do DNA com um fluorocromo dequado, é possível diferenciar esperma X de Y baseado na diferença total na fluorescência que varia para espécies diferentes, mas é aproximadamente uma diferença de 4% para gado bovino. Desde que os primeiros relatórios de análise de esperma usando-se citometria<sup>1,2</sup>, existe interesse considerável no uso da tecnologia para sexualização de esperma e pré-seleção de gênero subsequente em mamíferos humano e não humano. Relatórios anteriores em células<sup>1</sup> de esperma sexualizado bem sucedidamente e os primeiros nascimentos vivos com proporções<sup>2</sup> de sexo alteradas têm estimulado desenvolvimentos de balanceamento de gênero em humanos<sup>3</sup>, em programas de espécies ameaçadas<sup>5,6</sup>, e, mais recentemente, na procriação de gado bovino<sup>4</sup>. O patamar para uso comercial de citometria de fluxo como uma ferramenta de classificação industrial tem sido tornado possível através de aperfeiçoamentos na pré- e pós-classificação de manuseio de amostra, e através da modificação de vários aspectos de instrumentação de citômetro de fluxo para aperfeiçoar orientação e resolução X-Y<sup>7</sup>. Muitas células de esperma de mamífero são em forma de pá com dois eixos de simetria de espelho<sup>8</sup>. Dimensões aproximadas para cabeças de esperma de touro/bovino são 9 Dm (comprimento) x 4,5 Dm (largura) x 1 Dm (espessura) com uma calda de 40 Dm<sup>9,12</sup>. Esta ge-

ometria de célula pode resultar na medição de erros (artefatos óticos) quando se tenta medir a diferença aproximada de 4% (conforme observado por uma proporção de fluorescência aproximada de 2:1) que são para a orientação variável das células com relação ao sistema ótico de um citômetro de fluxo tradicional. Estudos anteriores nas células esféricas e, mais tarde, células de esperma conduzem a um número de aperfeiçoamentos na orientação de esperma através de efeitos hidrodinâmicos no bocal com uma vista para classificação<sup>10,11</sup>. Uma modificação adicional substitui o detector difusor de avanço tradicional de um citômetro de fluxo com um tubo fotomultiplicador para sensibilidade de fluorescência aumentada<sup>11</sup> e utilização conveniente das propriedades de simetria de espelho de esperma bovino. Combinadas, estas modificações foram usadas incorporadas em um instrumento comercial (MoFlo SX, Dako/Cytomation, CO) que é capaz de orientar entre 60% a 70% de células de esperma vivas intactas com taxas de análise de admissão se aproximando de 35.000 células seg<sup>-1</sup> e taxas de classificação de descarga de até 6.000 espermas X- e Y-por segundo<sup>4</sup>. Contudo, a operação destas taxas representa uma eficiência de classificação de somente 34% de cada das células X ou Y vivas disponíveis apresentadas à zona de interrogação. A eficiência de classificação e, portanto, produção é adicionalmente limitada quando operando sob estas condições através de fatores estatísticos e limitações de processamento de instrumento tais como tempo de morte, coincidência de queda e sobreposição entre populações X e Y, devido a coeficiente de variação para considerações de instrumento e biológicas, e o nível desejado de confiança requerido para regiões de classificação e a pureza de classificação X ou Y desejada (tipicamente maior do que 90%). A perda de célula observada devido a orientação imperfeita é tipicamente 30% a 40% que resulta nesta proporção de amostra que passa através do instrumento diretamente por desperdício, visto que ela não pode ser medida precisamente. Esta perda não necessariamente retarda o tempo de processamento do instrumento, e para o caso de alto custo, amostras de esperma preciosas ou limitadas (isto é, sêmem congelado de animais mortos ou espécies ameaçadas) desperdiçam esta proporção de material genético na

amostra, e, por ultimo, limita os beneficios do usuário final.

À parte do trabalho anterior no estudo e modificação da orientação de célula, pouca pesquisa tem sido conduzida para aperfeiçoar o sistema de detecção ótico especificamente para células esféricas como esperma.

5 Esforços para superar os artefatos óticos introduzidos pela forma de cabeça de esperma têm sido grandemente direcionados nas modificações de orientação fluídica. Sistemas de epi-iluminação anteriores proporcionam boa resolução independente de orientação<sup>13</sup>, contudo, suas células de fluxo fechado produzem classificação de alta velocidade não prática. Investigações de  
10 varredura de corte não encontram preferência para primeiro fluxo de cabeça-versus calda de células de esperma intactas através do ponto de inspeção<sup>14</sup>. Um sistema ótico radialmente simétrico que emprega um refletor parabolooidal envolvendo o jato total consequentemente utilizando um elemento de coleta ótico simples foi reportado para superar a dependência de orientação  
15 de célula em taxas de evento baixas<sup>15</sup>. Uma aproximação alternativa para superar os efeitos de orientação investiga o uso de interferometria para resolver cabeças de esperma X e Y não manchadas, contudo esta aproximação não produz CVs suficientemente baixas para capacitor pureza suficiente e velocidade de classificação<sup>16</sup>.

20 Apesar das perdas de 30% a 40% antes mencionadas devido à orientação de célula incorreta, os instrumentos da técnica anterior ainda combinam um feixe de laser simples e dois fotodetectores ortogonalmente posicionados (a 0° e 90° ao feixe) para classificação de esperma.

Aqui, apresenta-se uma nova aproximação para a análise de alta  
25 resolução de células esféricas tal como esperma por modelagem de perfis de fluorescência e estudo da dependência angular de iluminação e detecção em um citômetro de fluxo. Introduziu-se um sistema de detecção quad ótico aumentado em um esforço para reivindicar novamente alguma proporção de célula que atualmente vai diretamente para desperdício. Com classificação  
30 em mente, este sistema é testado para capacidade específica para resolver teor de DNA de esperma suportando X e Y para determinar a utilidade provável desta aproximação em sexualização de esperma e outras aplicações

de medição de citometria de fluxo de alta resolução.

### MATERIAIS E MÉTODOS (Ex1Bição 1)

#### Preparação de Células de Esperma para Análise e Classificação

Alíquotas de sêmem de touro fresco foram estendidas em um  
 5 TALP à base de HEPES a uma concentração final de  $160 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$   
 conforme determinado por um NucleoCounter SP-100 (ChemoMetec AJS,  
 Allerod, Denmark). Um TALP de manchamento Hoechst 33342 (HO, Invitro-  
 gen Corp., Eugene, OU) (Bis-Benzimide, H-33342; H21492, Molecular Pro-  
 bes) foi adicionado a esta amostra e incubado sobre um período de 45 minu-  
 10 tos a  $34.5^\circ\text{C}$  (concentração de mancha HO final  $72,9 \mu\text{M}$  ou  $9 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). Após  
 incubação da amostra, um volume equivalente de tampão foi adicionado pra  
 ajustar o pH da solução de aproximadamente 7,4 a 6,8 para otimizar saúde  
 do esperma para produzir uma concentração de amostra final de  $80 \times 10^6$  cé-  
 lulas  $\text{ml}^{-1}$ . Este tampão também continha um agente de coloração de alimen-  
 15 to (Red #40, Warner Jenkinson Co., Inc, St. Louis, MO) que age para resfriar  
 rapidamente fluorescência de HO de células mortas de modo a proporcionar  
 um meio para classificar especificamente células vivas. As amostras foram  
 pipetadas desta mistura em tubos de teste de polipropileno de 5 ml para  
 análise e classificação no citômetro de fluxo.

#### 20 Instrumentação de Citometria de Fluxo

Um classificador de esperma MoFlo SX configurado para sexua-  
 lização de esperma (Cytomation Inc., Fort Collins, CO recentemente adquiri-  
 do por Beckman Coulter, Fullerton, CA), foi usado para experimentação.  
 Modificações específicas para este instrumento incluem 1) substituição do  
 25 fotodiodo difusor de avanço com uma objetiva de microscópio de abertura  
 numérica  $20 \times 0,42$  (NA) (Mitutoyo America Corp., Aurora, IL) e tubo fotomul-  
 tiplicador (PMT) para capacitar fluorescência de  $0^\circ$  versus  $90^\circ$  (figura 31A),  
 2) usando-se um bocal de orientação de costume designado, 3) expansão  
 da faixa de voltagem de PMT a valores inferiores, 4) extensão da funcional-  
 30 dade de processamento de sinal digital paraa análise de dados e visualiza-  
 ção, e 5) utilização de uma frequência quase-CW (taxa de repetição 80MHz)  
 triplicada Nd:YVO4 laser (Vanguard 350mW, Newport Corporation, CA) para

excitação de 355 nm da amostra com um formador de feixe de laser que produz estreitamento de ponto de  $25 \times 160 \text{ Dm } 1/e^2$  no ponto de interrogação, e em uma descarga de operação nominal de 175 mW.

Para os estudos, a configuração esboçada acima foi adicionalmente modificada. Para estudos de ângulo de excitação o feixe de laser foi dividido em trajetórias múltiplas conforme mostrado na figura 31 A, que é uma esquemática (vista de topo) de layout de detecção ortogonal padrão para análise de teor de DNA de esperm  $0^\circ$  e  $90^\circ$ , mas com ângulos de excitação adicionais de  $45^\circ$  e  $90^\circ$  sobre o típico  $0^\circ$  somente B: layout de quad detector (vista de topo e lateral) mostrando objetivas de  $0^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $90^\circ$  e  $135^\circ$ , filtros e detectores de PMT envolvendo o jato em uma configuração aninhada (com uma redução à metade subsequente de energia de laser em cada trajetória) para proporcionar iluminação angular seletiva de  $0^\circ$ ,  $45^\circ$ , ou  $90^\circ$  com relação à configuração padrão  $0^\circ$ . O sistema ótico quad-detector (QDOS) é mostrado em projeções de topo e vista lateral na figura 31 B. Consequentemente, dois objetivos adicionais 10x (NA = 0,28, Mitutoyo America Corp., Aurora, IL) e PMTs (H957-12 Hamamatsu Corporation, Bridgewater, NJ) são aninhados além de  $0^\circ$  e  $90^\circ$  de detectores a  $45^\circ$  e  $135^\circ$  a partir do eixo de iluminação padrão  $0^\circ$  para captar derramamento-sobre-fluorescência fora do cone de aceitação de cada respectiva 20x objetiva em um arranjo master-escravo. Um filtro ótico de passagem longa ELP410 (10LWF-400-B/51280, Newport Corp., Irvine, CA) foi localizado diretamente em frente de cada detector para proporcionar transmissão de fluorescência de célula manchada, enquanto bloqueia difusor de laser. A introdução de elementos de detector adicionais requer modificações de usinagem a serem feitas em várias das placas de alumínio que compõe a torre de inspeção MoFlo. Esta configuração aninhada de QDOS proporciona uma banda horizontal de coleta de luz perto de continua de células que se deslocam através do jato centrado de  $0^\circ$  a  $135^\circ$ . Desse modo, dados os dois eixos de simetria de espelho, uma célula de esperma que se desloca com seu eixo mais longo paralelo àquele do fluxo será mensurável independente de sua orientação rotacional sobre este eixo. Em todos os estudos, a pressão de invólucro foi ajustada

para 275,7903KPa (2,76 bar (40 psi)). A amostra par pressão diferencial de invólucro foi alterada para obter taxas de evento sobre a faixa 2.000 a 50.000 eventos  $s^{-1}$  dependendo da proposta de teste (por exemplo, efeito de orientação de bocal ou CV e estudos de divisão de resolução). A menos que  
5 de outro moo citado, os dados apresentados neste relatório foram obtidos a 35.000 eventos  $s^{-1}$ .

#### Modelo de Fluorescência de Célula

Uma simulação de traço de raio de Monte Carlo foi planejada para gerar e perfilar emissão de fluorescência provavelmente aproximada de  
10 uma célula de esperma. A célula de esperma foi modelada em Matlab (The Mathworks, Natick, MA) como um elemento similar a lente e fenômeno ótico, tais como reflexão, refração, transmissão, absorção e reflexão interna total foi levada em consideração. Foi assumido que os fluorocromos (fontes de ponto de kuz) são distribuídos aleatoriamente através de toda cabeça de  
15 esperma. Neste modelo, para um milhão de pontos de partida aleatoriamente localizados (fontes de fóton de moléculas fluorescentes), várias geometrias simples incluindo retângulo, retângulo capeado, e elipse foram usadas para determinar o perfil de fluorescência aproximado para células alinhadas com o eixo mais longo ao longo da direção de fluxo. O índice de refração da  
20 célula de esperma viva foi tomado como  $n_c = 1,42$  de um relatório prévio<sup>9</sup> e o fluido de invólucro circundante  $n_s = 1,333$ . Os efeitos refrativos no fluido de invólucro para limite de ar foram descuidados, visto que é assumido que a célula la é centrada dentro da região de núcleo estreito do jato cilíndrico de 100 Dm.

#### 25 RESULTADOS (Exibição 1)

##### Modelo de Fluorescência de Célula

Conforme mostrado na fotografia da figura 32 A, células de esperma que são posicionadas na borda para desviar a objetiva do microscópio são mais brilhantes do que aquelas apresentadas com sua face plana.  
30 (O sinal integrado de cada uma das células é medido (usando-se software de processamento de imagem J, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) para ser aproximadamente a mesma intensidade total.

Esta diferença (proporção) é similar àquela experimentada em um citômetro de fluxo<sup>1,2</sup>. Contudo, existem muito poucos dados publicados, espaçados de um relatório anterior<sup>2</sup> sobre a faixa aproximada de ângulos sobre a qual este perfil de fluorescência assimétrico ocorre.

5                   As descobertas de modelo de Monte Carlo (figura 32 B-D) geralmente suportam esta diferença de face de duas dobras para borda em intensidade de fluorescência (aproximadamente 1,6 a 1 para o retângulo capeado, e 2,5 a 1 para a elipse). O modelo também proporciona uma estimativa da dependência angular deste efeito, que pode ser usado para guiar o  
10 desenho de uma geometria de detecção ótica apropriada para proporcionar resolução aperfeiçoada para células esféricas tais como as células de esperma aqui apresentadas.

Uma imersão no perfil de intensidade é prognosticada para todas as geometrias estudadas. É difícil medir a presença desta imersão experimentalmente, visto que um ângulo de coleta muito baixo seria requerido, e orientação de célula de esperma muito precisa seria necessária para fazer  
15 medições com a resolução angular necessária; contudo, seria interessante estudar este fenômeno prognosticado em maiores detalhes com instrumentação apropriada (ótica). Também de interesse é a proporção de emissão de fluorescência da borda para face, onde o modelo produz um valor de pico  
20 dentre 1.6:1 para o retângulo a aproximadamente 2.5:1 para a geometria elíptica. Estes valores se comparam a uma proporção medida de aproximadamente 2:1 nos estudos e aqueles de outros<sup>2</sup>.

Este resultado é talvez não surpreendente, visto que este perfil  
25 elíptico mais 'orgânico' pode ser esperado equiparar a geometria biológica de uma célula. Contudo, quando se comparando aos resultados modelos com valores experimentais, deve-se também considerar o ângulo sólido ou ângulo aceitável de elementos óticos usados para coleta de luz que integrará e, portanto, amortecerá a observação de dependência de ângulo na fluorescência medida. Indiferente da geometria modelada, um perfil de intensidade  
30 de fluorescência perto de uniforme é prognosticado sobre uma faixa angular de  $\pm 60^\circ$  fora da face plana da célula de esperma. Esta observação é impor-

tante quando se seleciona elementos óticos para medição de fluorescência de esperma. Isto é para assegurar que um número suficiente de elementos de coleta de luz são empregados quando elementos de NA baixos são usados, ou que erros de medição não são introduzidos onde elementos de NA  
5 altos são usados (isto é, com ângulos de coleta maiores do que  $\pm 60^\circ$  que integraria luz emitida da face plana e borda estreita de células de esperma, portanto, diminuindo a precisão de medição.

Na figura 32 A é mostrada uma imagem de esperma bovino manchado de Hoechst 33342 obtida em um microscópio de fluorescência mostrando células de borda orientada e observador de face plana. Os resultados de simulação ótica de Monte Carlo optical (traço de raio) para intensidade de fluorescência de uma célula de esperma (eixo de fluxo na página) para várias geometrias são mostradas nas figuras 32 B-D, incluindo B: retângulo, C: retângulo capeado, e D: geometrias elípticas, os planos das  
10 quais são perpendiculares ao eixo de fluxo.

#### Orientação de célula vs. Fluorescência Medida

Figura 33 mostra gráficos de intensidade de fluorescência bivariada  $0^\circ$  vs.  $90^\circ$  Hoechst 33342 para células de esperma manchadas vivas excitadas em uma geometria de excitação de feixe  $0^\circ$  tradicional com (figura  
20 33 A) e sem (figura 33 B) orientação de célula fluídica planar em uma taxa de evento de  $25.000 \text{ eventos s}^{-1}$ . Ambos os gráficos exibem uma população em forma de L característica representando células que são de borda para o detector de  $90^\circ$  (direita inferior), borda para o detector de  $0^\circ$  (esquerda superior), ou em algum lugar orientada. Células mortas e transicionais podem ser vistas na região esquerda inferior (região R1 2) do gráfico em um perfil de intensidade inferior que imita aquele das células vivas. Tem sido observado que células de esperma intactas tendem a serem alinhadas com seu eixo mais longo ao longo de sua direção de fluxo<sup>14</sup>. Neste arranjo, as células que são orientadas da borda para o detector 90 são tipicamente presas um tanto  
25 arbitrariamente e analisadas para medição de DNA X-Y de alta resolução comercial e classificação. Na figura 33 C a percentagem da população de célula viva total contida dentro de subpopulações caindo em cada um de um  
30

número (11) de regiões dimensionadas similares a partir da direita inferior (R1) para a esquerda superior (R1-1) da população L é mostrada que representa aproximadamente 0° a 90° de orientação de célula. A partir deste gráfico, o efeito de orientação fluídica pode claramente ser vista por uma curva alterada para a esquerda indicando um aumento na proporção de células alinhadas com relação ao detector lateral. Nas regiões 1-4 (equivalente à região que um portão de orientação seria ajustado para classificação), aproximadamente 70% da população viva é orientada vs. 25% sem orientação fluídica. R6 tem uma percentagem artificialmente alta (aproximadamente duas vezes o número) de células para ambos conjuntos de dados, visto que neste ângulo com um arranjo de detector ortogonal não é possível distinguir células orientadas a 45° para a fonte de excitação daqueles exatamente orientados 90° para fora a 135°. A partir deste conjunto de dados, pode ser visto que com orientação fluídica empregada, aproximadamente 5% de células permanecem imensurável porque elas não produzem diferenças claras de XY. As razões possíveis para isto incluem 1) células não estando em um ângulo apropriado aos detectores para capacitar medição de resolução de alta confiança fora da face plana, e 2) células orientadas perto da borda para a fonte de excitação que apresenta uma área de seção transversal menor para captura de luz eficiente e, portanto, fluorescência.

Assim, as figuras 33 A-C mostram o efeito de orientação fluídica em células de esperma através do ponto de inspeção de um citômetro de fluxo. A: nenhuma orientação B: Orientação C: percentagem de células que caem dentro de cada de 11 regiões de tamanho equivalente através de população de esperma vivo sem e com orientação fluídica em uma taxa de evento de 35.000 eps.

#### Ângulo de Excitação vs. Fluorescência

Os gráficos apresentados nas figuras 34 A-C mostram o efeito de ângulo de iluminação (0°, 90°, e 0° + 90° respectivamente) em perfil bivariado para células aleatoriamente orientadas. Consequentemente, a influência do ângulo de iluminação pode claramente ser vista. Iluminação 0° (figura 34 A) produz a forma de L característica com uma parte de dobra-curso ao

longo do braço superior e evidência de populações distintas X e Y na região direita inferior. Conforme esperado, iluminação de 90° (figura 34 B) reverte a posição da dobra para o braço inferior, e, de fato, a capacidade de resolver esperma X e Y (o papel de cada um dos detectores foi trocado) na região esquerda superior. Pela troca de ambos os lasers (figura 34 C), e redução da energia de laser pela metade para assegurar exposição constante de luz de células, uma população em forma de L simétrica é gerada com evidência de divisões ao longo de cada braço do L, mas com curvatura agora aparecendo em cada extremidade. Pode-se explicar este resultado considerando-se que células que são borda em um dos lasers absorverão mais luz devido a guia de onda do que aquela em um ângulo leve e que será mais inclinada para refletir luz. Este artefato pode ser superado por separação especial dos feixes de excitação ao longo do eixo de fluxo (dados não mostrados); contudo, implicações comerciais podem limitar a praticabilidade desta aproximação visto que a energia do laser necessitaria ser dobrada para assegurar excitação ótima da célula (que, por sua vez, aumenta a irradiação total e dose de células quando atravessando a região de interrogação), e detectores adicionais seriam requeridos para evitar restrições de taxa de análise devido à coincidência de partícula.

Uma função zoom foi usada para visualizar diferenças entre conjuntos de dados mais claramente.

#### Adição de Par de Detector 45° e 135°

Em uma tentativa de aumentar a eficiência de classificação de sexualização de esperma, um par de detector ortogonalmente equiparado foi introduzido para medir células com suas bordas orientadas perto de 45° e 135° para o eixo ótico do citômetro de fluxo (figura 31 B). Este par de detector foi inserido para coletar derrame sobre luz a partir das objetivas de coleta existentes para determinar efeitos de taxa de classificação aditivos. Este arranjo foi também escolhido após consideração dos resultados de simulação de fluorescência de célula, estudos de iluminação e restrição de espaço em e ao redor da região de inspeção. Este sistema de detecção tem um número de vantagens potenciais. Primeiro, a análise alta de primeira ordem que pro-

duz rotineiramente mais do que 60% de orientação é mantida para assegurar a medição existente e desempenho de classificação não é comprometida. Segundo, por colocação de óticos (de uma abertura numérica inferior) atrás das objetivas originais em uma configuração disparada (figura 31 B),  
5 que são capazes de coletar luz em uma banda próxima de contínua ao redor do ponto de inspeção. Terceiro, a interferência mecânica potencial entre componentes custosos e altamente customizados é evitada.

Os dados adquiridos usando-se a configuração quad são apresentados na figura 35. Deve ser notado que o bocal de orientação foi retido  
10 neste estudo para maximizar orientação de célula com relação a pares de detector recentemente introduzidos  $0^\circ$ - $90^\circ$  e  $45^\circ$ -  $135^\circ$ . A figura 35 A mostra fluorescência de Hoechst  $0^\circ$  vs.  $90^\circ$  para uma população de esperma manchado típico com populações de célula vivas (R1-R3) e mortas (R4, 12,2% de todas as células) envolvidas, e regiões R1R1 (53,9%, ou 61,8% de células  
15 vivas), e R2 (22,4%) e R3 (7,0%) células combinadas circundantes orientadas e não orientadas com relação ao detector de  $90^\circ$  (isto é, borda de brilho). A figura 35 B mostra todas as células conforme medidas pelo par de detector de  $45^\circ$ -  $135^\circ$ . Aqui, o dado mostra uma forma L simétrica com células esquerdas superiores sendo orientadas de borda a  $45^\circ$  e direita inferior  
20 sendo orientada para  $135^\circ$ . Esta simetria é esperada, visto que as células são expostas a excitação similar devido à área de corte transversal apresentada para o laser para qualquer orientação. Penetração adicional na orientação de célula pode ser ganha pelo estudo das frações vivas presas de células não orientadas (de R2) na figura 35 C, e células orientadas (de R1) na  
25 figura 35 D. Dos 22,4% da região R2, as posições mostradas para regiões R5 e quantidade de R6 a um adicional de 8,2% + 9,8% (18%) disponível para classificação sobre e acima de 53,9% julgado apropriado para classificação da região R1. Contudo, na prática nós encontramos resolução de divisão para ser mais pobre para os detectores de  $45^\circ$  e  $135^\circ$  do que aquele para o  
30 detector de  $0^\circ$ . Espera-se que esta diferença seja devido à excitação subótima de células, visto que elas estão em um ângulo para a fonte de excitação comparado àquelas células em R1, e devido a eficiência de coleta significan-

temente inferior dos óticos de coleta de luz. O efeito exagerado de iluminação subótima (isto é, para células orientadas de borda para a fonte de excitação) pode ser visto na figura 35 B em populações que se estendem para a parte mais esquerda inferior do gráfico. Para amostras mais vivas operando em taxas de eventos de 35.000 células  $s^{-1}$ , esta população representa a remanescente típica 4-8% de células vivas cujas divisões XY não podem ser envolvidas.

Assim, a figura 35 mostra a análise de fluorescência de quad detector de 200000 células de esperma mostrando A: layout de fluorescência tradicional  $0^\circ$  vs  $90^\circ$  com orientação aumentada com relação a detector de  $90^\circ$  (R1),  $0^\circ$  (R3), entre (R2), e células mortas (R4), B: layout de detector  $45^\circ$  vs  $135^\circ$  de todas as células, C: células presas de R2 pertencentes àquelas orientadas de borda para  $45^\circ$  (R5) e  $135^\circ$  (R6) detectores respectivamente, e D: bivariado mostrando posição de células orientadas R1R1 conforme observado usando-se par de detector  $45^\circ$ -  $135^\circ$ .

A figura 36 mostra dado de histograma preso para cada um dos detectores de alta resolução  $0^\circ$  (figura 36 A),  $45^\circ$  (figura 36 B), e  $135^\circ$  (figura 36 C) de conjunto de dado provido na figura 35 onde em cada caso, divisões XY (4% de diferença) podem ser observadas indicando que frações de pureza de alta classificação seriam possíveis desta amostra usando este esquema de detecção.

Assim, a figura 36 mostra histogramas de fluorescência para amostra adquirida na figura 35, mostrando uma divisão XY em cada de A:  $0^\circ$ , B:  $45^\circ$ , e C:  $135^\circ$  detectores.

Importantemente, a adição de detectores  $45^\circ$  e  $135^\circ$  mostra que medições de DNA X-Y podem ser feitas para um adicional de 15-20% de células vivas, e que com esquemas apropriados, estas células podem ser classificadas em um modo aditivo àqueles tradicionalmente considerados para serem orientados. Em investigações de classificação preliminares (taxa de evento de admissão de 35.000 células  $s^{-1}$ ), verificou-se, dependendo da amostra e qualidade ejaculada de touro, é possível classificar um adicional de 800 a 1500 X células de esperma  $s^{-1}$  no topo de aproximadamente 4500

a 6000 células  $s^{-1}$  com nenhuma diferença detectável em pureza entre populações classificadas. As considerações de classificação adicionais e o efeito de alterar taxas de evento serão o estudo de investigações adicionais, e o desempenho de fisiologia e reprodutivo de várias frações orientadas também serão considerados. Contudo, os ganhos deste trabalho preliminar representam um aumento nas taxas de classificação e portanto, produção de entre 18-25%, com ganhos de eficiência de classificação de aproximadamente 6% de esperma X vivo total (isto é, de 34% a 40% de células X vivas disponíveis assumindo uma proporção de 50:50 de células X: Y células) sobre métodos de classificação de esperma comercial atuais.

#### Iluminação 45°

Para investigar o efeito do ângulo de iluminação na medição de conteúdo de DNA de alta resolução, as células foram excitadas em dois ângulos distintos (0° e 45°, figura 31 A), enquanto se observam perfis de dado bivariado de fluorescência de 45° vs 135°. Com iluminação 0° (figura 37 A), uma população simétrica é observada que não mostra inclinação em intensidade de fluorescência para células que são alinhadas com uma borda para qualquer detector. Contudo, quando o ângulo de excitação é alterado para estar em 45°, uma inclinação súbita, mas claramente observável ocorre. A região esquerda superior da população viva neste gráfico não mais mostra um ressalto para valores de intensidade de fluorescência inferior com relação ao detector de 135° (de fato, este gráfico agora imita proximamente aquele obtido com iluminação 0° e detecção 0° vs. 90° conforme esperado). Desse modo, forma este resultado, pode-se ver que para células que são orientadas em um ângulo de mais do que aproximadamente 45° a partir da orientação preferida que apresente uma área máxima para a fonte de excitação, iluminação subótima, e, portanto, resolução de X-Y comprometida. Desse modo, algum meio adicional de excitação seria requerido se medidas de alta resolução são desejadas para células que são maiores do que 45° para a orientação preferida.

A figura 37 mostra a iluminação de célula a A) 0°, e B) 45° com relação a par de detector de 45° e 135° mostrando dependência de orienta-

ção em excitação de célula ótima e medição de teor de DNA.

#### DISCUSSÃO (Exibição 1)

Neste relatório, apresentaram-se as descobertas de vários estudos nos efeitos de iluminação e detecção na fluorescência de célula com aplicações de sexualização de célula em mente. Pelo desenvolvimento e uso de um modelo de Monte Carlo, simulou-se o perfil de fluorescência ao redor de uma célula de esperma. Baseado no dado deste trabalho combinado com os estudos de iluminação, designou-se, construiu-se e testou-se um sistema de quad detecção que quando combinado com orientação de célula aumenta a fração utilizável de células para análise e, por último, classificando de aproximadamente 34% a 40% de células X vivas disponíveis. Dependendo da ejaculação de touro usada, este ganho representa um adicional de 800 a 1500 células que, de outro modo, teria sido enviada a corrente de desperdício (em adição a entre 4500 a 6000 células  $s^{-1}$ ) que pode ser classificada sem comprometer a pureza. Se empregado no uso de rotina, tais aperfeiçoamentos proporcionariam vantagens para aplicações de sexualização de esperma comercial e científicas variando de animais domésticos a espécies ameaçadas.

#### REFERÊNCIAS / LITERATURA CITADA

1. Gledhill BL, Lake S, Steinmetz LL, Gray JW, Crawford JR, Dean PN and Van Dilla MA. Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution. *J Cell Physiol* 1976;87:367-376.
2. Van Dilla MA, Gledhill BL, Lake S, Dean PN, Gray JW, Kachel V, Barlogie B, Göhde W. Measurement of mammalian sperm deoxyribonucleic acid by flow cytometry: problems and approaches. *J Histochem Cytochem* 1977;25:763-773.
3. Fugger EF. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. *Theriogenology* 1999;52:1345-1440.
4. Garner DL, Seidel GE. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 2008;69:886-895.
5. O'Brien JK, Robeck TR. Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Reprod Fer-*

- til Dev 2006;18:319-219.
6. O'Brien JK, Stojanov T, Chriton EG, Evans KM, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric sorting of fresh and frozen-thawed spermatozoa in the lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *Am J Primatol* 2005;66:297-315.
- 5 7. Johnson LA, Flook JP, Look MV, Pinkel D. Flow Sorting of X and Y chromosome -bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Research* 1987;16: 1-9.
8. Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preslection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction* 1989;41:199-203.
- 10 9. Van Duijn C, Van Voorst C: Precision measurements of dimensions, refractive index and mass of bull spermatozoa in the living state. *Mikroskopie* 1971;27: 142-167. 10. Kachel V, Kordwig E, Glossner E. Uniform lateral orientation, caused by flow forces, of flat particles in flow-through systems. *J Histochem Cytochem* 1977;25:774-780.
- 15 11. Johnson LA, D Pinkel: Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 1986;7:268-273.
12. Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 20 2006;65:943-957.
13. Skogen-Hagenson MJ, Salzman GC, Mullaney PF, Brockman WH: A High Efficiency Flow Cytometer. *J Histochem Cytochem* 1977;25:784-789.
14. Rens W, Welch GR, Houck DW, van Oven CH, Johnson LA: Slit-scan flow cytometry for consistent high resolution DNA analysis of X- and Y-chromosome bearing sperm. *Cytometry* 1996;25:191-199.
- 25 15. Sharpe JS, Schaare PN, Kunnemeyer R. Radially symmetric excitation and collection optics for flow cytometric sorting of assymetrical cells. *Cytometry* 1997;29:363-370.
16. Van Munster EB. Interferometry in flow to sort unstained X- and Y-chromosome-bearing bull spermatozoa. *Cytometry* 2002;47: 192-199.
- 30 Morrell JM, Keeler KD, Noakes DE, Mackenzie NM, Dresser DW: Sexing of sperm by flow cytometry. *The Veterinary Record* 1988;2:322-324.

## REIVINDICAÇÕES

1. Aparelho de análise de célula, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 5       - uma fonte de célula (1) que inclui uma pluralidade de células (2) a serem analisadas;
- um canal (4) que define um eixo de fluxo (8) e através do qual as referidas células fluem, em que o referido canal (4) define uma linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (13) e uma linha de alinhamento de eixo curto da seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (14) que é ortogonal a referida  
10       linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (13), em que o referido canal (4) é configurado para orientar as referidas células (2) de modo que a referida célula (2) apresenta em orientação total durante uma iluminação de célula,
- 15       - um projetor de radiação eletromagnética (15) estabelecido para efetuar a referida iluminação de célula por projeção da radiação eletromagnética nas referidas células (2),
- um primeiro detector de radiação eletromagnética (21) e um segundo detector de radiação eletromagnética (22), cada um estabelecido  
20       para detectar radiação eletromagnética emitida como um resultado da referida iluminação de célula, no qual o referido primeiro detector de radiação eletromagnética (21) tem um eixo do primeiro detector de fluxo ortogonal (41) e o referido segundo detector de radiação eletromagnética (22) tem um eixo do segundo detector de fluxo ortogonal (42); no qual o referido eixo do primeiro detector de fluxo ortogonal (41) é coaxial com referida linha de ali-  
25       nhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (13), em que o referido eixo do segundo detector de fluxo ortogonal (42) é coaxial com referida linha de alinhamento de eixo curto da seção transversal de célula de fluxo ortogonal (14), em que o referido eixo do primeiro detector de fluxo ortogonal (41) e o referido eixo do segundo detector  
30       de fluxo ortogonal (42) são 90 graus espaçados,
- um terceiro detector de radiação eletromagnética (23) e um

quarto detector de radiação eletromagnética (24), cada um estabelecido para detectar radiação eletromagnética emitida como um resultado da referida iluminação de célula, no qual o referido terceiro detector de radiação eletromagnética (23) tem um eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal (43) e o  
5 referido quarto detector de radiação eletromagnética (24) tem um eixo do quarto detector de fluxo ortogonal (44), em que o referido eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal (43) e o referido eixo do quarto detector de fluxo ortogonal (44) são 90 graus espaçados, e em que o referido eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal (43) é de 30 graus a 60 graus da referida linha de  
10 alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (13).

2. Aparelho de análise de célula de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que cada referido terceiro e quarto detector de radiação eletromagnética (23) (24) coletam radiação eletromagnética que se  
15 desloca em um plano de fluxo ortogonal.

3. Aparelho de análise de célula de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que cada referido terceiro e quarto detector de radiação eletromagnética (23) (24) não coletam qualquer radiação eletromagnética que se desloca em uma direção ortogonal ao fluxo.

20 4. Aparelho de análise de célula de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (13) define um primeiro lado no qual é estabelecido o referido projetor de radiação eletromagnética e um segundo lado.

25 5. Aparelho de análise de célula de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o referido eixo do segundo detector de fluxo ortogonal (42) está no referido segundo lado.

30 6. Aparelho de análise de célula de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o referido eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal (43) está no referido segundo lado.

7. Aparelho de análise de célula de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um classificador de cé-

lula (84) estabelecido em fluxo ascendente de um local da referida iluminação de célula.

8. Aparelho de análise de célula de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido canal (4) é selecionado a partir do grupo consistindo de: uma extremidade de bocal de orientação (5) e um canal microfluídico (7).

9. Aparelho de análise de célula de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um controle motorizado (90) que ajusta controlavelmente a posição de pelo menos um dos referidos detectores e o referido projetor de radiação eletromagnética.

10. Método de retroassentamento de citômetro de fluxo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

A – segurar um citômetro de fluxo, com definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, para um procedimento de retroassentamento, no qual o referido citômetro de fluxo compreende:

i - uma fonte de célula (1) que inclui uma pluralidade de células (2) a serem analisadas;

ii- um canal (4) que define um eixo de fluxo (8) e através do qual as referidas células (2) fluem, em que o referido canal (4) define uma linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (13) e uma linha de alinhamento de eixo curto de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (14) que é ortogonal à referida linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (13), em que o referido canal (4) é configurado para orientar referidas as células (2) de modo que a referida célula apresenta uma orientação total durante uma iluminação de célula,

iii- um projetor de radiação eletromagnética (15) estabelecido para efetuar a referida iluminação de célula por projeção da radiação eletromagnética nas referidas células (2), um primeiro par de detector de radiação eletromagnética que inclui um primeiro detector (21) e um segundo detector (22), cada um estabelecido para detectar radiação eletromagnética emitida como um resultado de uma iluminação de célula, em que o referido primeiro

detector (21) tem um eixo do primeiro detector de fluxo ortogonal (41) e o referido segundo detector (22) tem um eixo do segundo detector de fluxo ortogonal (42); em que o referido eixo do primeiro detector de fluxo ortogonal (41) é coaxial com referida linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (13), em que o referido eixo do segundo detector de fluxo ortogonal (42) é coaxial com a referida linha de alinhamento de eixo curto de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (14), em que o referido eixo do primeiro detector de fluxo ortogonal (41) e o referido eixo do segundo detector de fluxo ortogonal (42) são 90 graus espaçados, em que o referido método de retroassentamento de citômetro de fluxo compreende ainda as etapas de:

B – estabelecimento de um terceiro detector de radiação eletromagnética (23) e um quarto detector de radiação eletromagnética (24) para cada um detectar radiação eletromagnética emitida como um resultado da referida iluminação de célula, em que o referido terceiro detector de radiação eletromagnética (23) tem um eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal (43) e o referido quarto detector de radiação eletromagnética tem um eixo do quarto detector de fluxo ortogonal (44), em que a referida etapa de estabelecimento de um terceiro detector de radiação eletromagnética (23) e o referido quarto detector de radiação eletromagnética (24) compreende a etapa de estabelecimento do referido terceiro detector de radiação eletromagnética (23) e o referido quarto detector de radiação eletromagnética (24) de modo que:

i- o referido eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal (43) e o referido eixo do quarto detector de fluxo ortogonal (44) são 90 graus espaçados, e

ii- o referido eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal (43) é de 30 graus a 60 graus da referida linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (13).

11. Método de retroassentamento de citômetro de fluxo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que cada referido terceiro e quarto detector de radiação eletromagnética (23) (24) coletam radia-

ção eletromagnética que se desloca em um plano de fluxo ortogonal.

12. Método de retroassentamento de citômetro de fluxo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que cada referido terceiro e quarto detector de radiação eletromagnética (23) (24) não coletam  
5 qualquer radiação eletromagnética que se desloca em uma direção ortogonal ao fluxo.

13. Método de retroassentamento de citômetro de fluxo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que cada referido primeiro e segundo detector de radiação eletromagnética (21) (22) coleta radi-  
10 ação eletromagnética que se desloca em um plano de fluxo ortogonal.

14. Método de retroassentamento de citômetro de fluxo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a referida linha de alinhamento de eixo longo de seção transversal de célula de fluxo ortogonal pretendida (13) define um primeiro lado no qual é estabelecido referido pro-  
15 jetor de radiação eletromagnética (15) e um segundo lado.

15. Método de retroassentamento de citômetro de fluxo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o referido eixo do segundo detector de fluxo ortogonal (42) está no referido segundo lado.

16. Método de retroassentamento de citômetro de fluxo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o referido eixo do terceiro detector de fluxo ortogonal (43) está no referido segundo lado.  
20

17. Método de retroassentamento de citômetro de fluxo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido canal (4) é selecionado a partir do grupo consistindo de: uma extremidade de bo-  
25 cal de orientação (5) e é um canal microfluídico (7).

18. Método de retroassentamento de citômetro de fluxo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de estabelecimento de um controle motorizado de modo a ajustar controlavelmente a posição de pelo menos um dos referidos detectores e  
30 referido projetores de radiação eletromagnética.

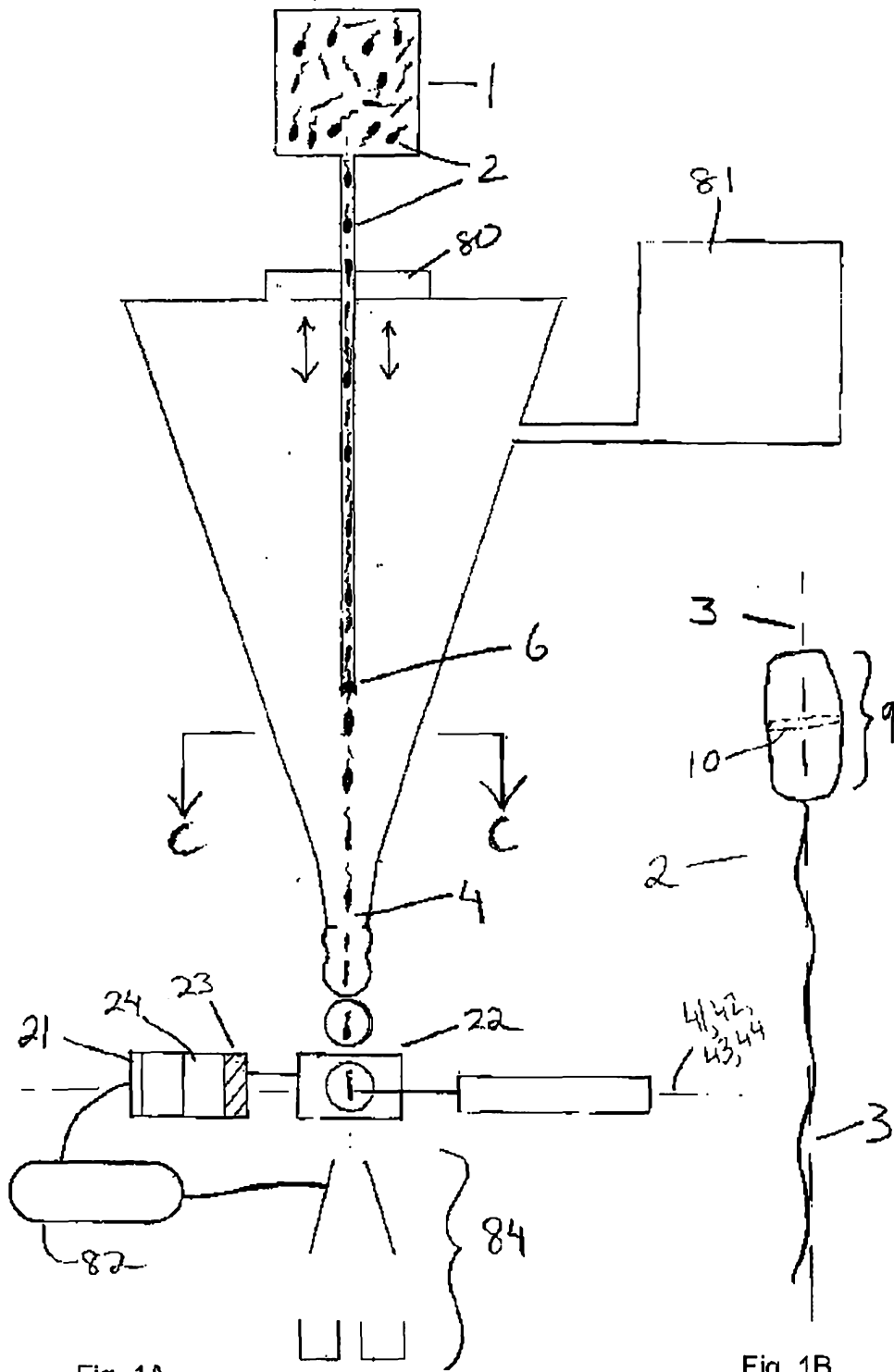


Fig. 1A

Fig. 1B

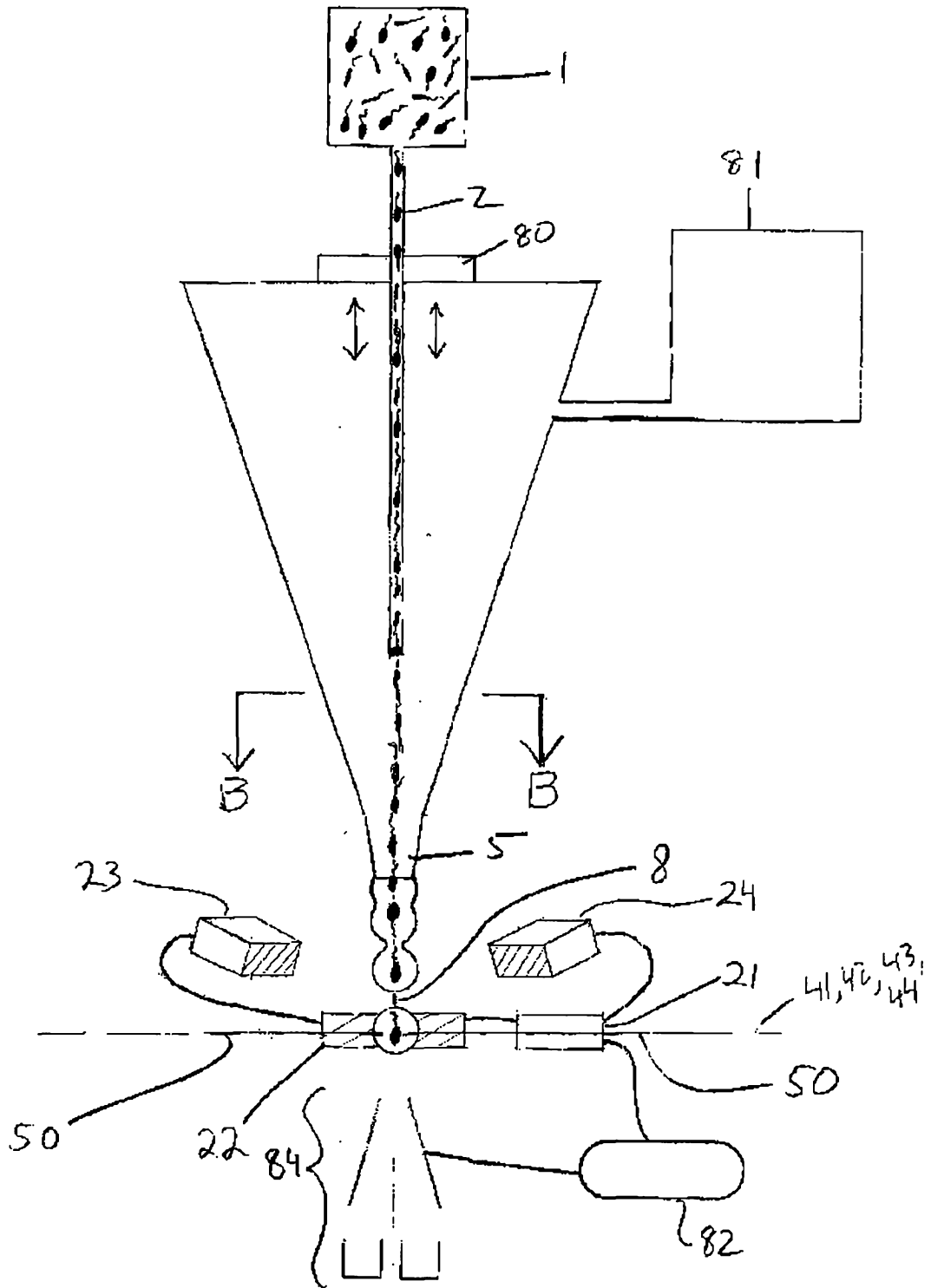


Fig. 2

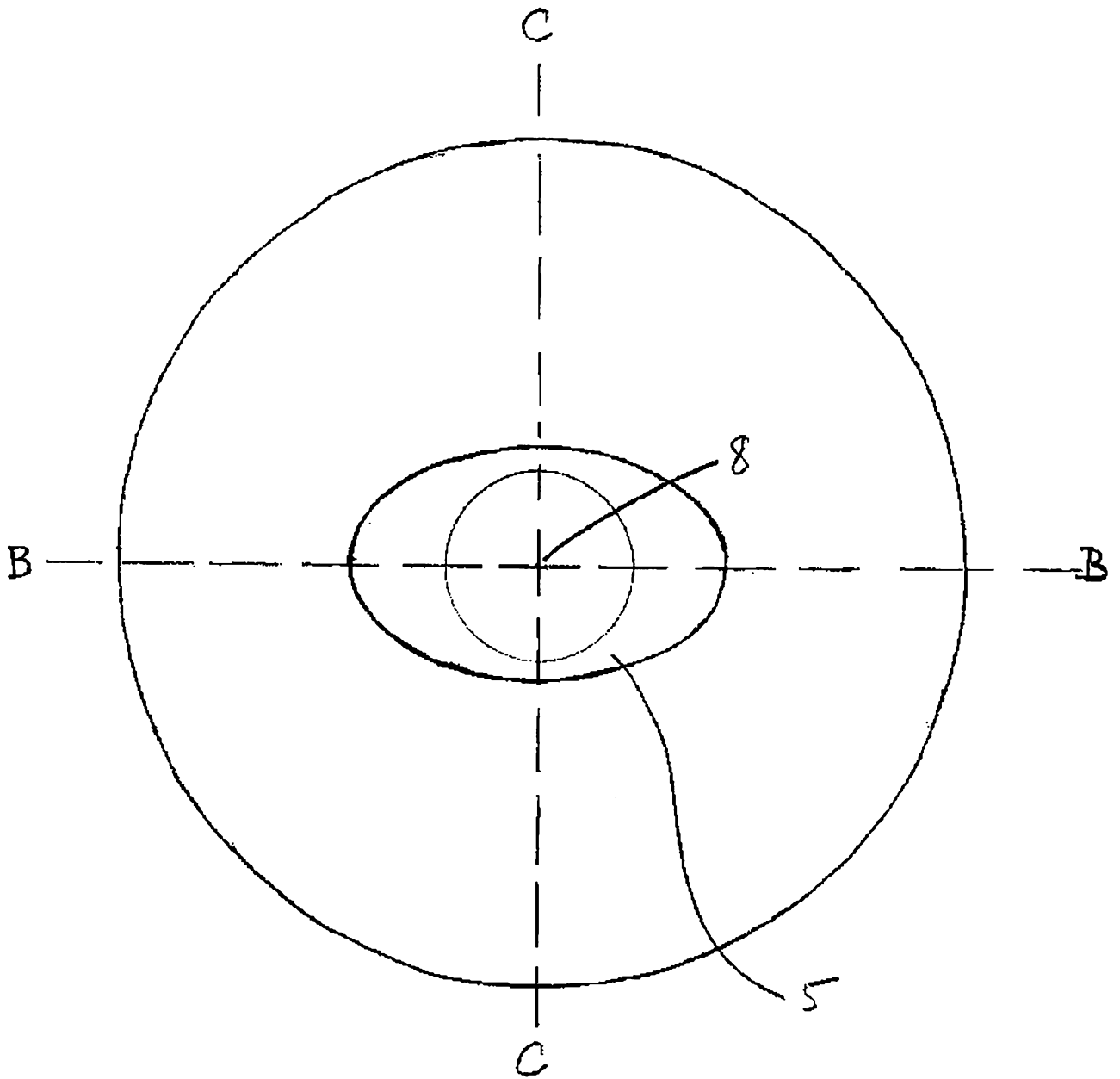


Fig. 3

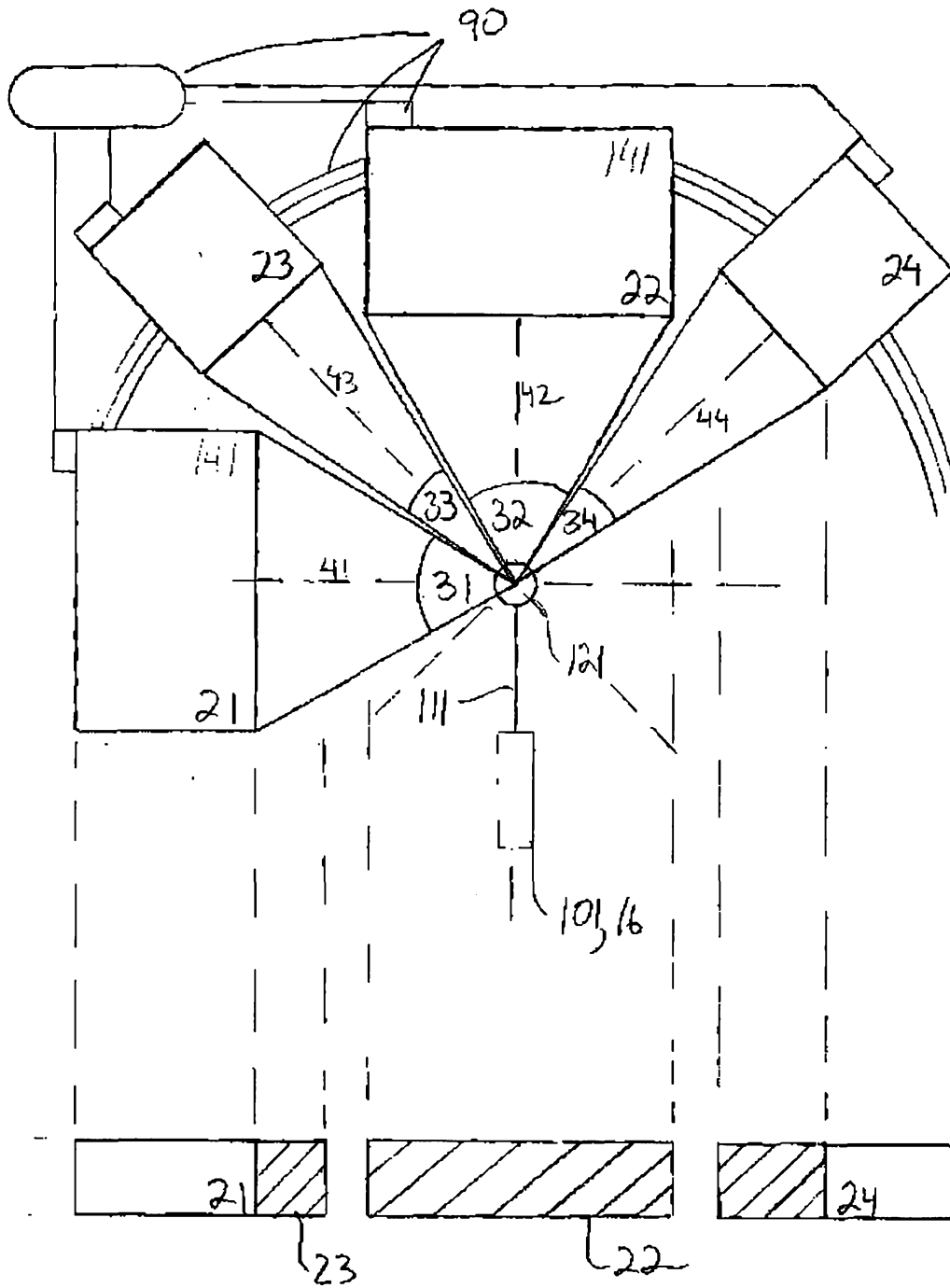


Fig. 4

5/27

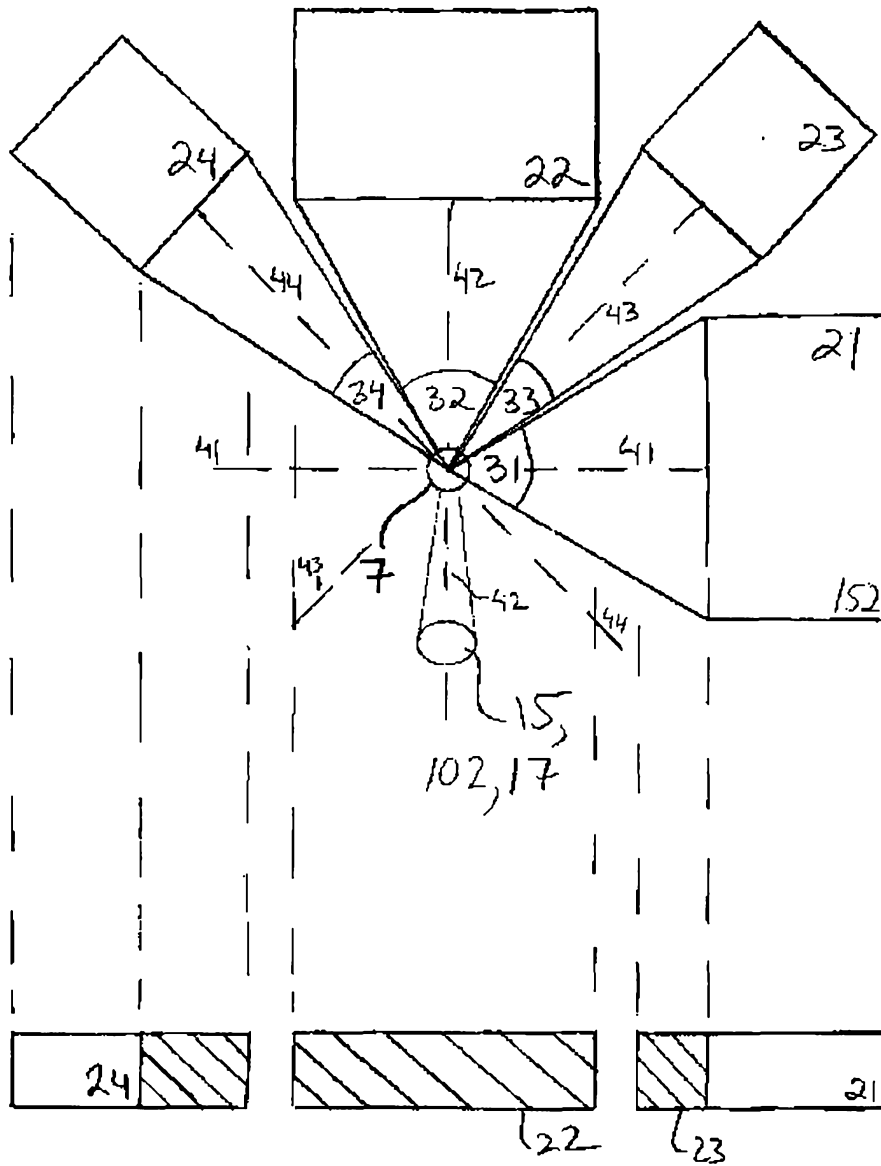


Fig. 5







9/27

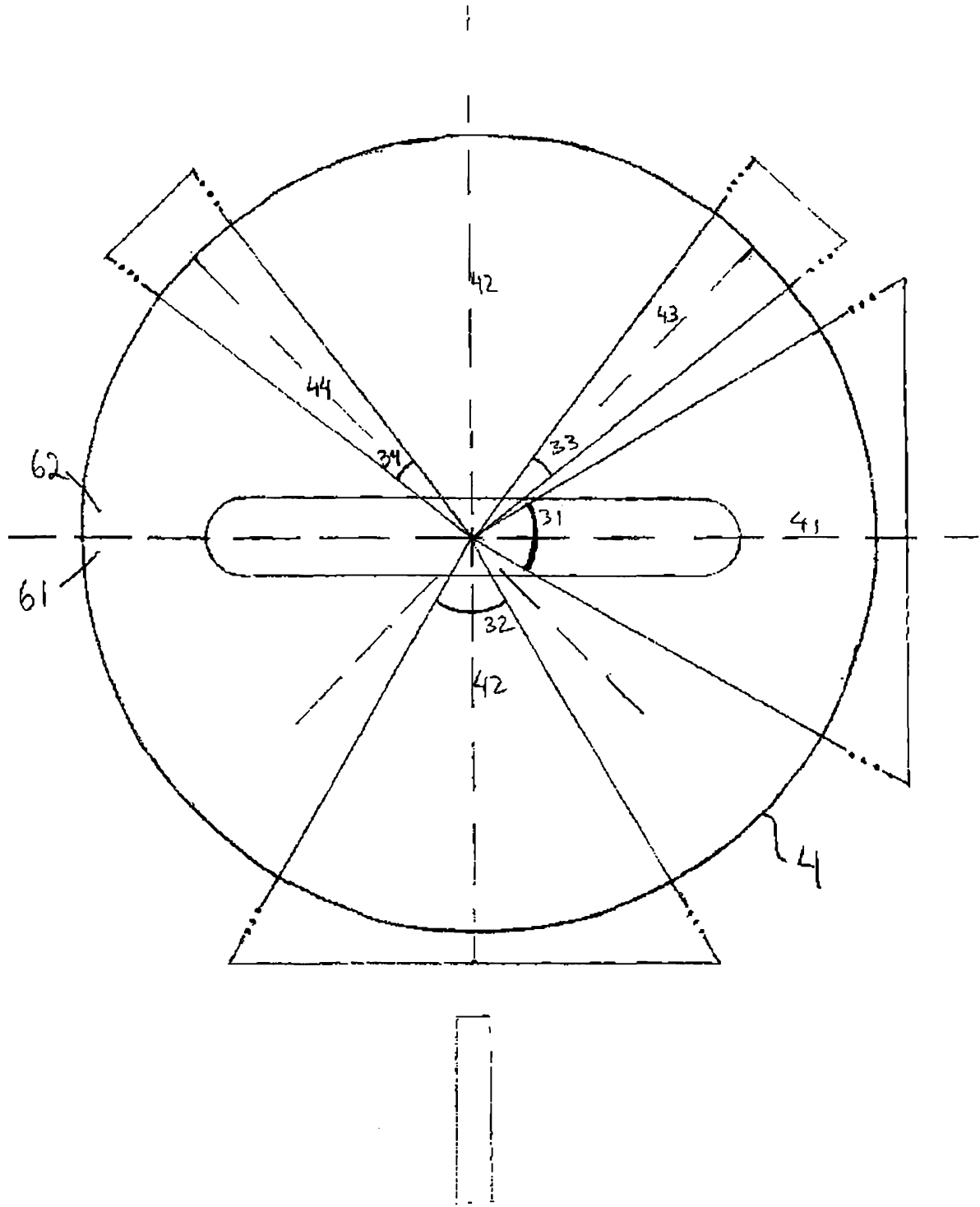


Fig. 9

10/27

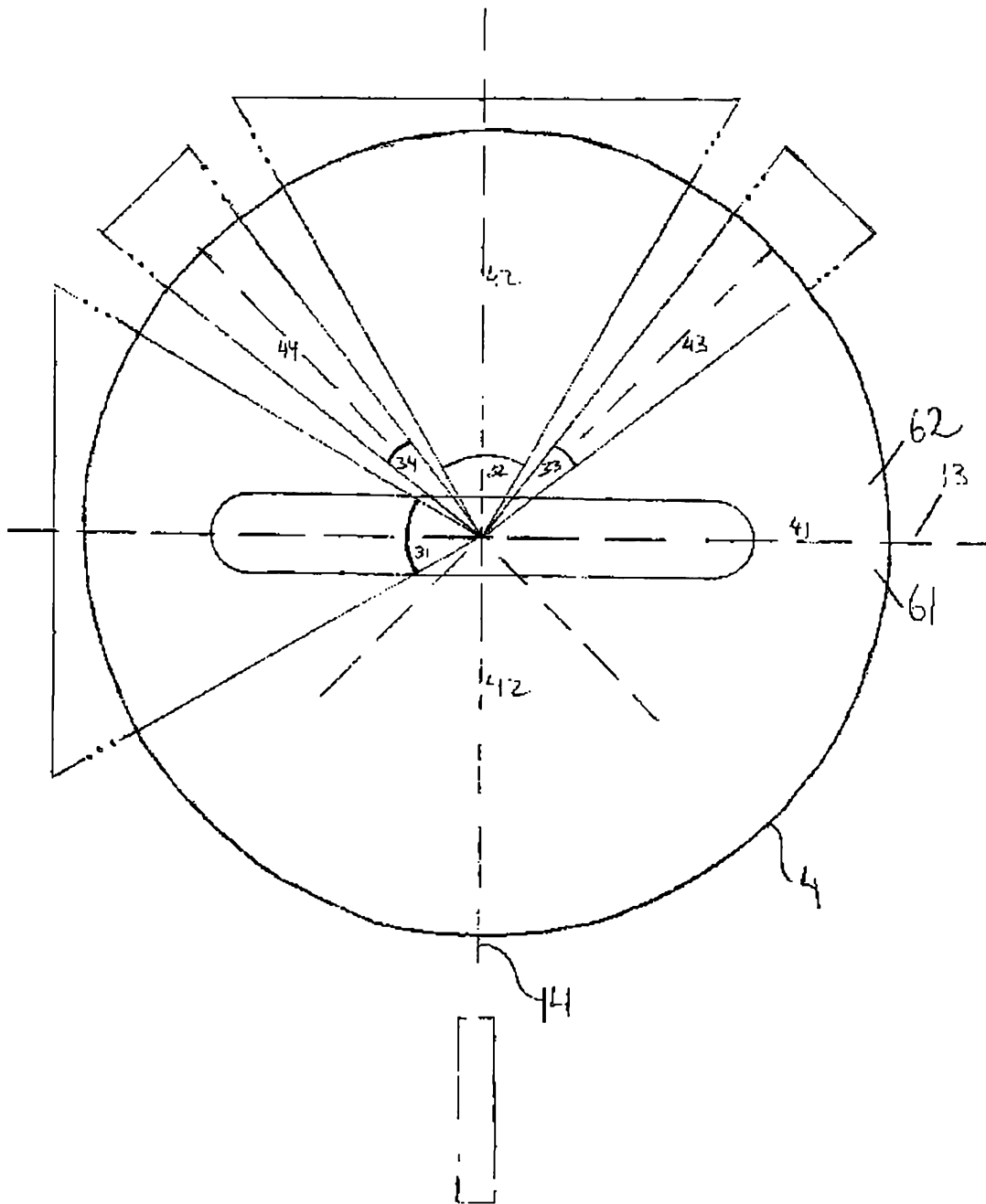


Fig. 10

11/27

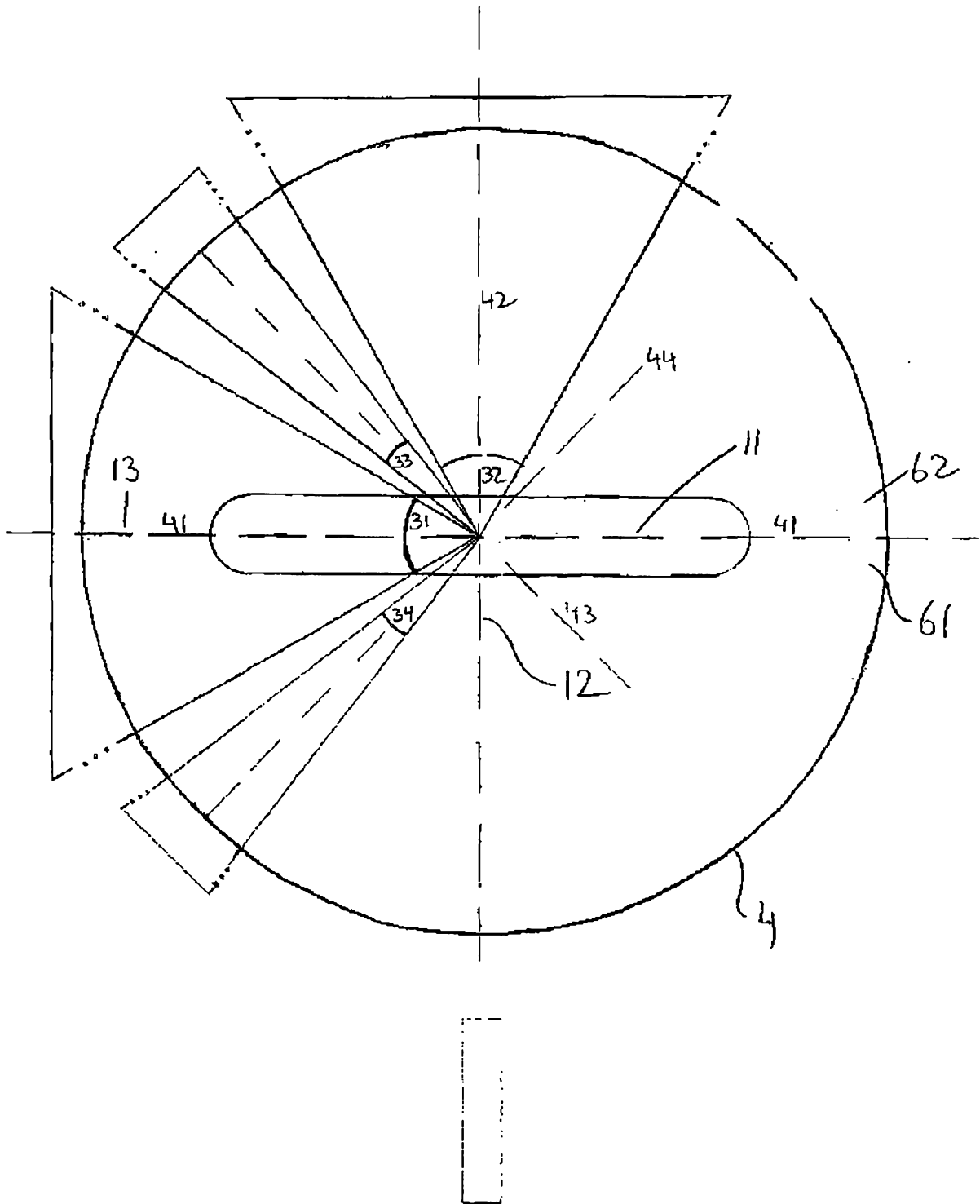


Fig. 11

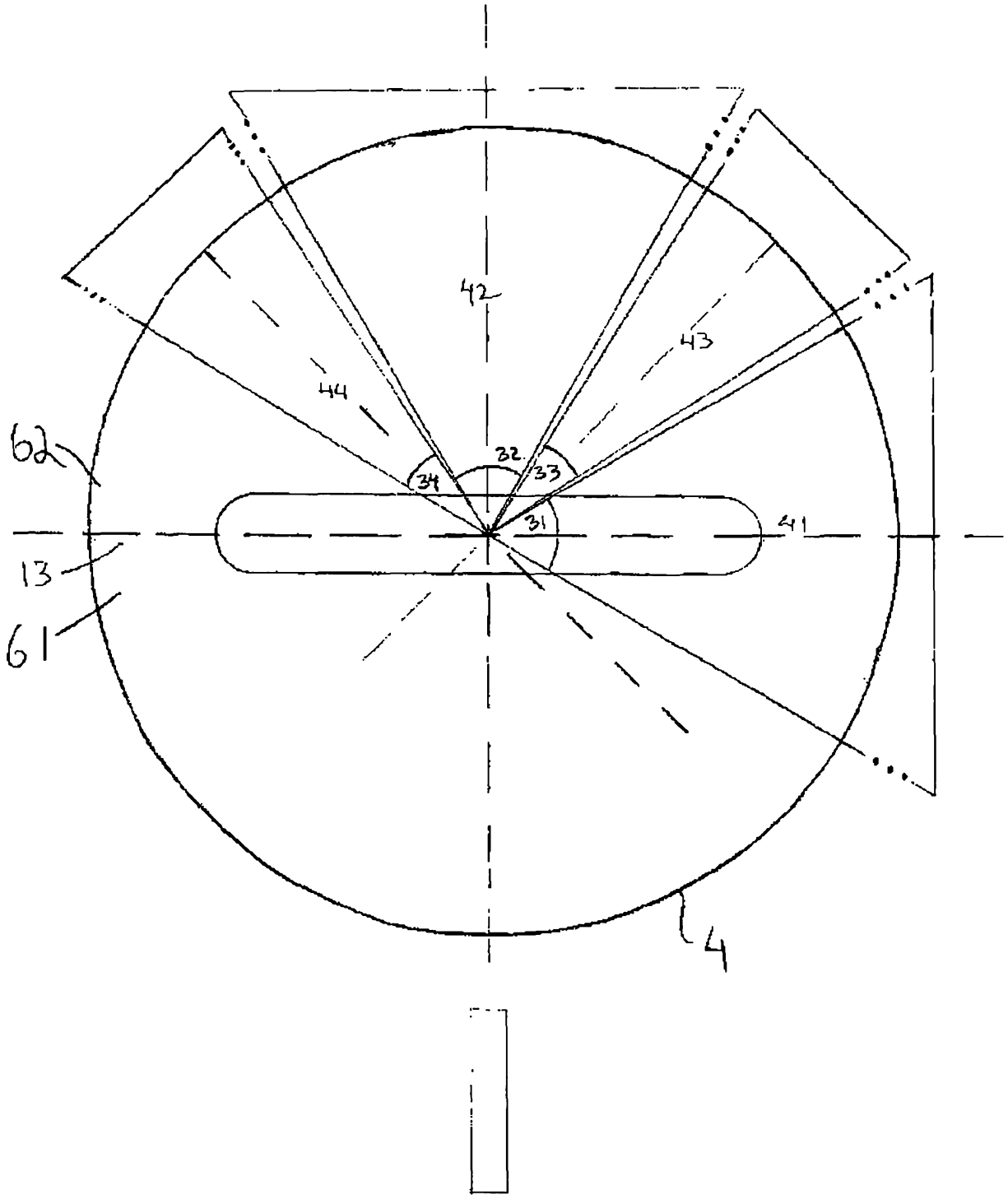


Fig. 12

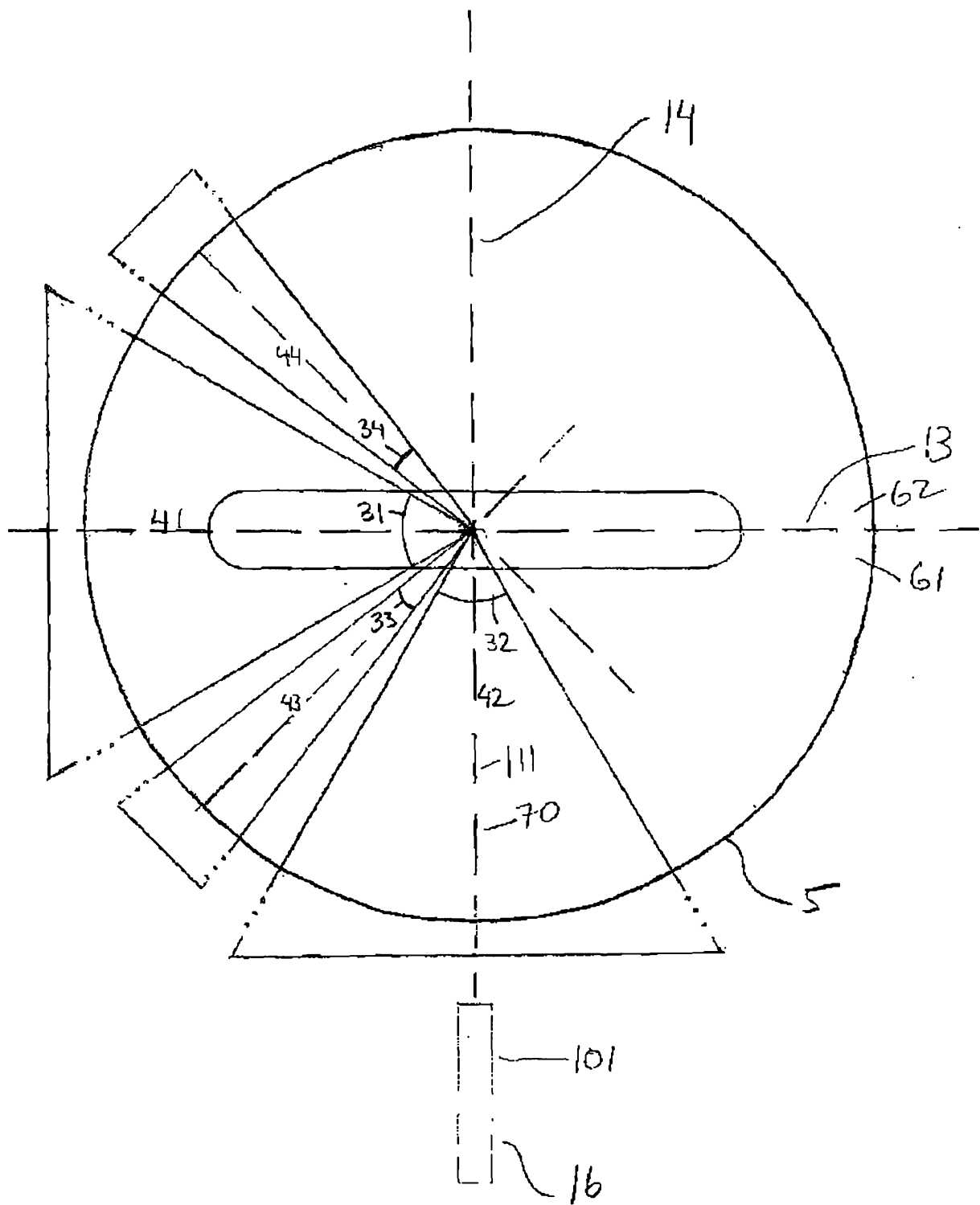


Fig. 13

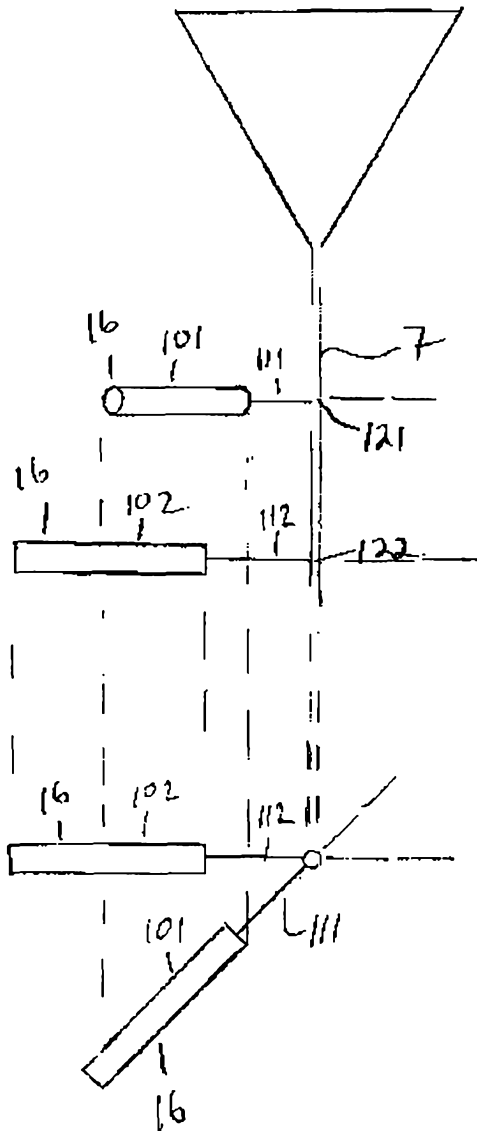


Fig. 14

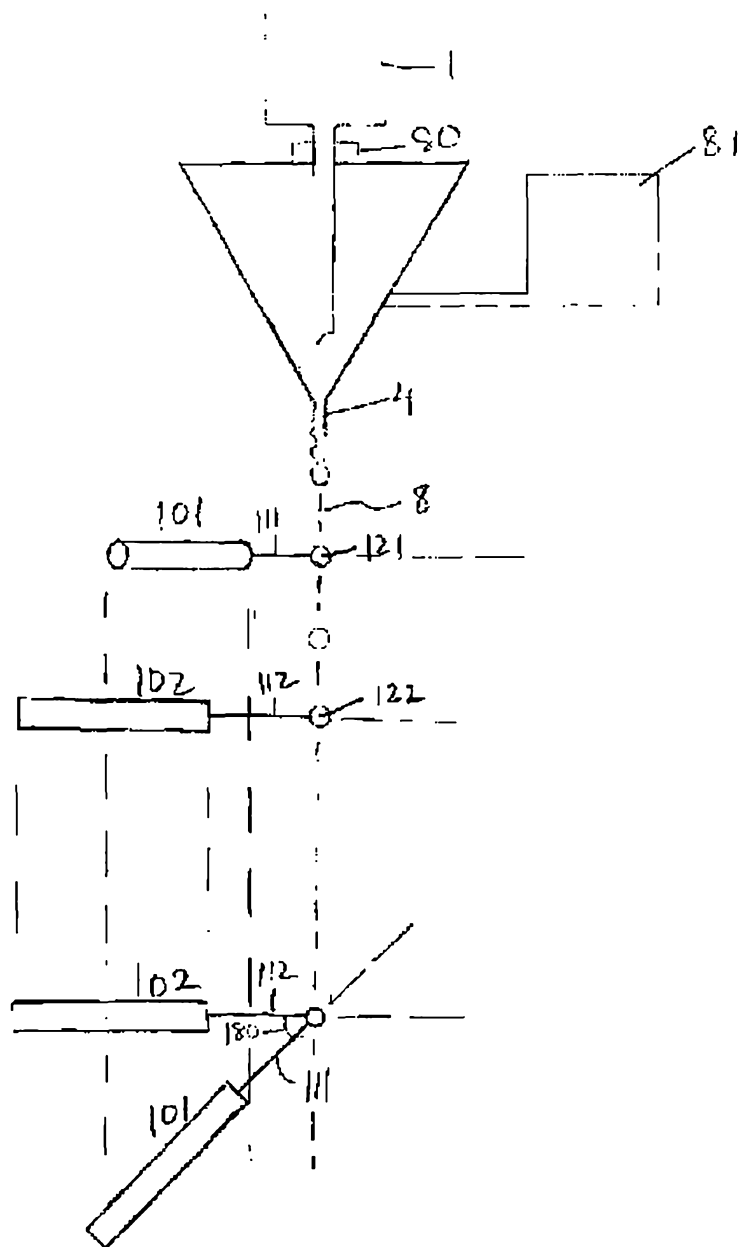


Fig. 15

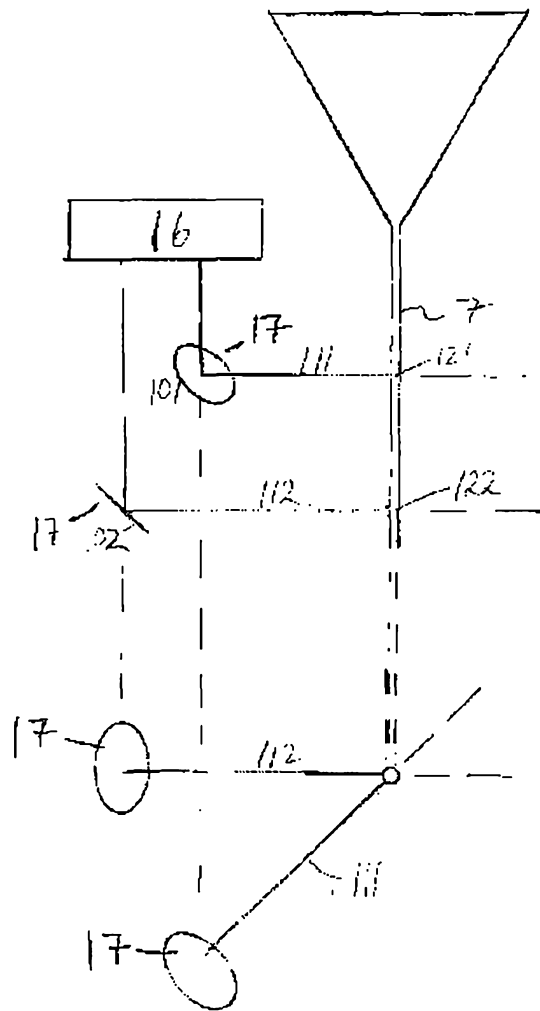


Fig. 16

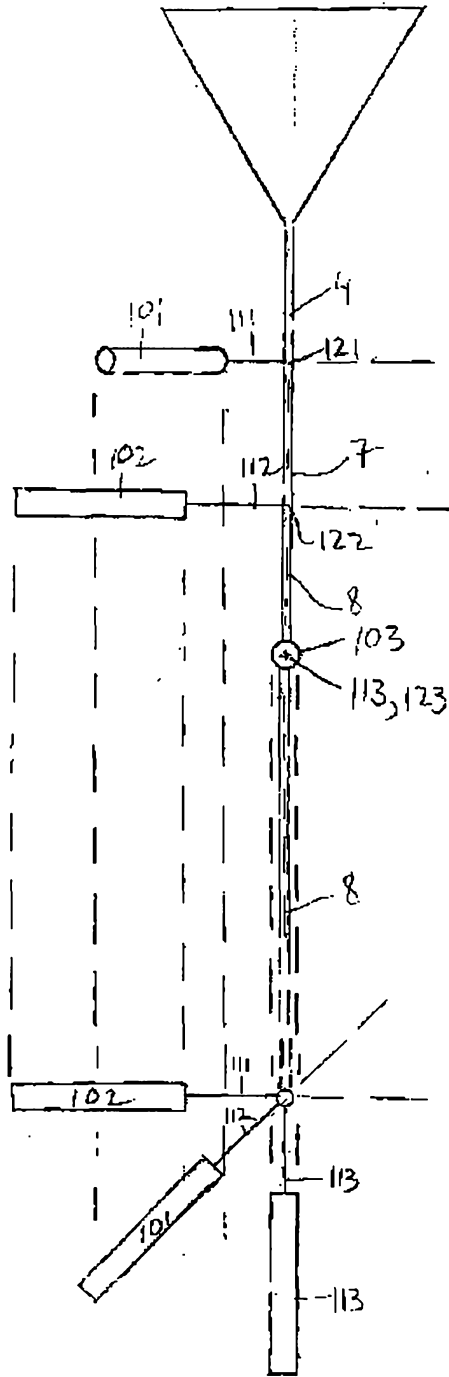


Fig. 17

18/27

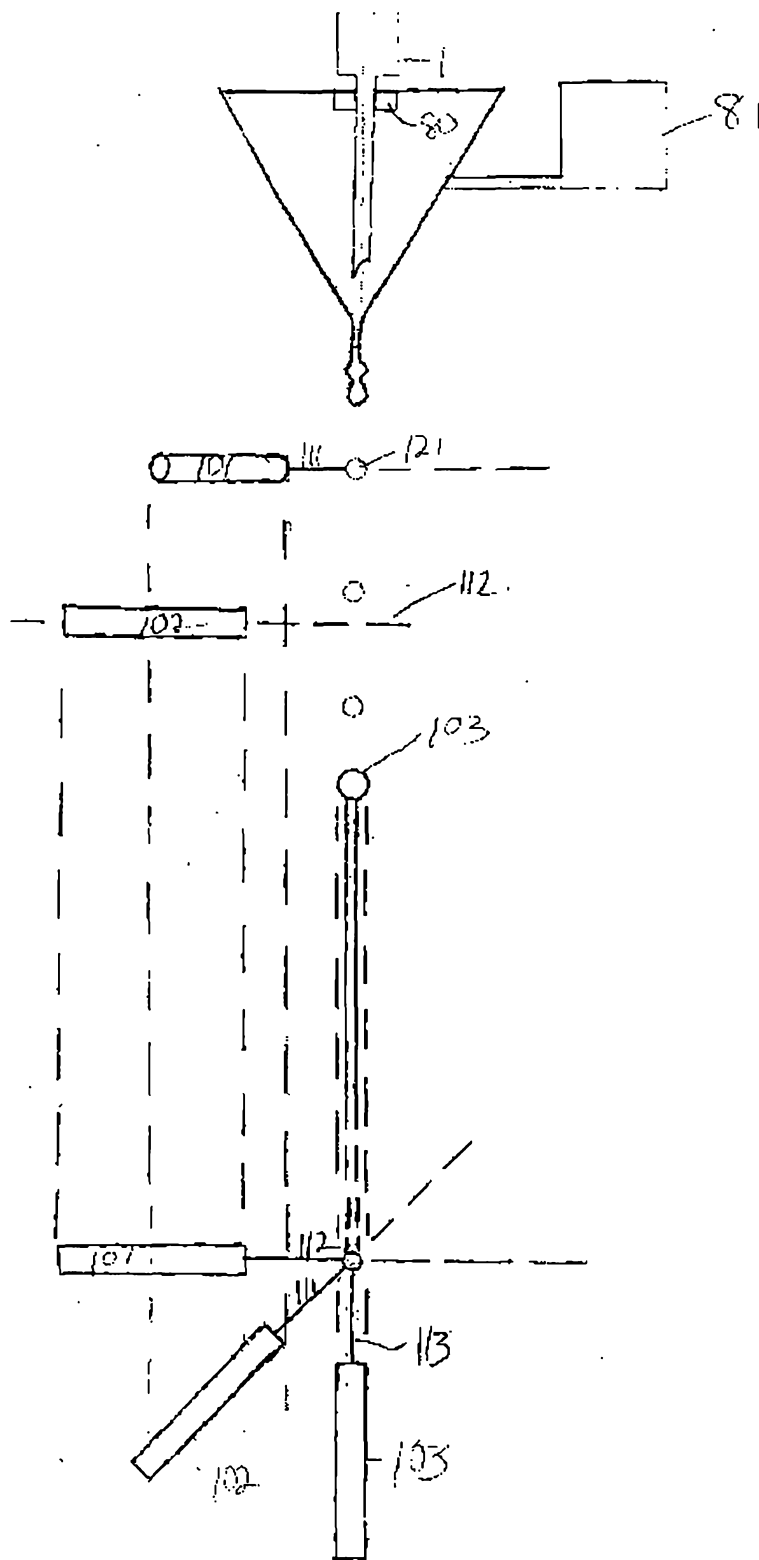


Fig. 18

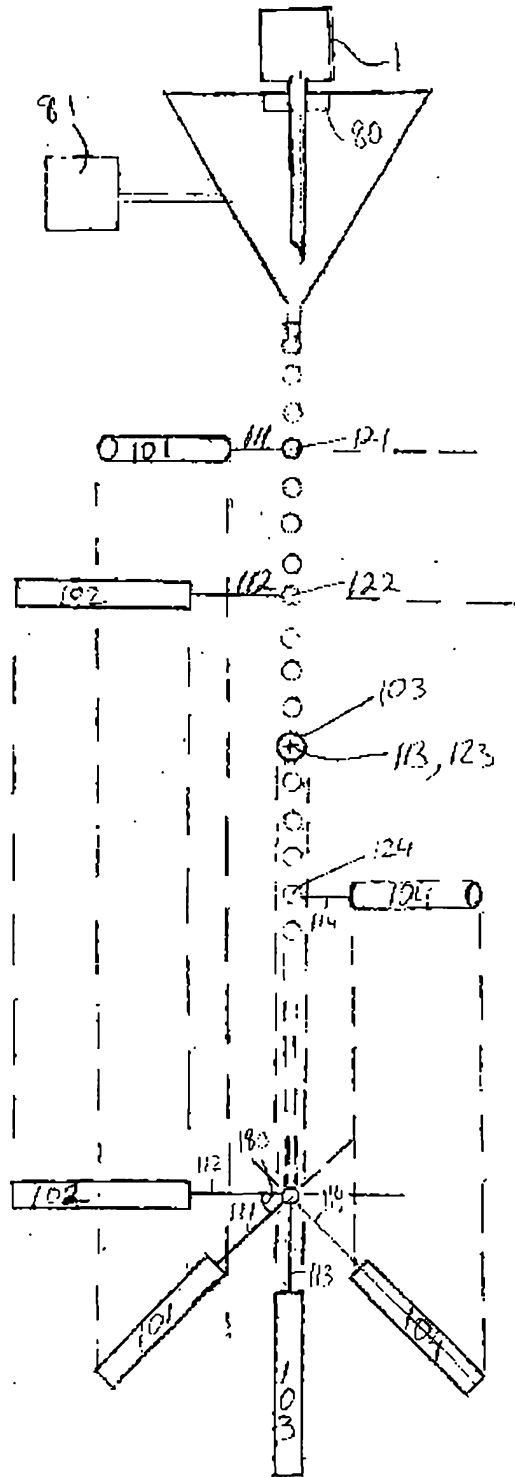


Fig. 19

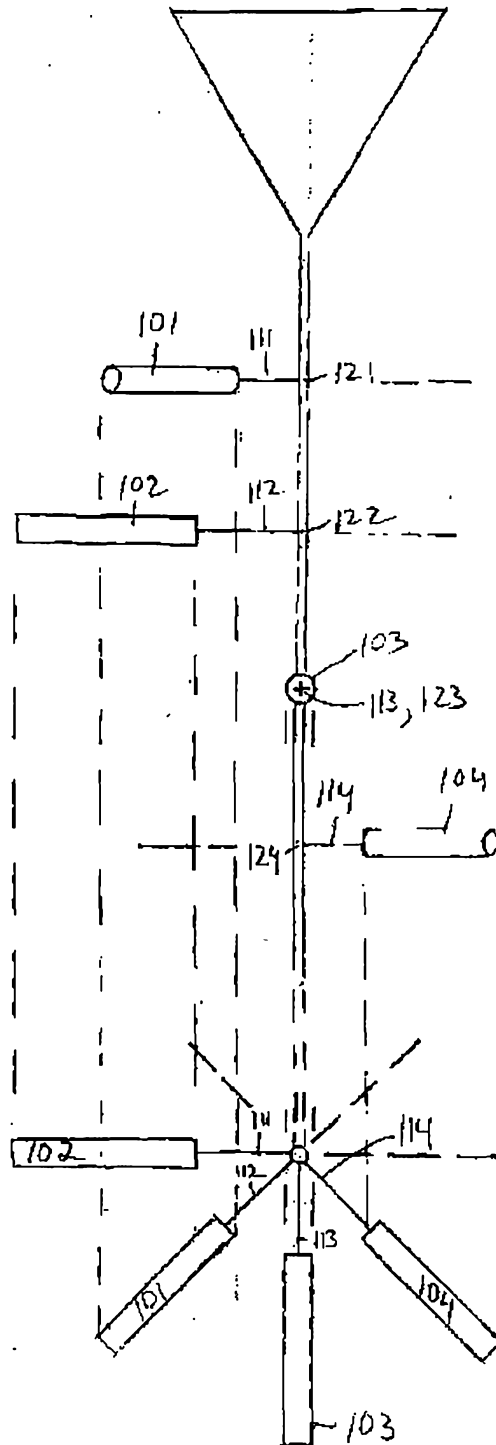


Fig. 20

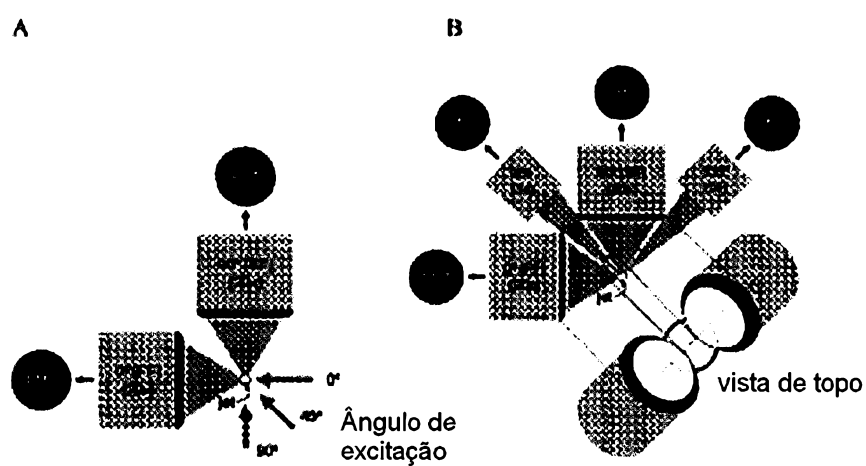


Fig. 31. A: Esquemática (vista de topo) de layout de detecção ortogonal padrão para análise de teor de DNA de esperm  $0^\circ$  e  $90^\circ$ , mas com ângulos de excitação adicionais de  $45^\circ$  e  $90^\circ$  sobre o típico  $5 \times 0^\circ$  somente B: layout de quad detector (vista de topo e lateral) mostrando objetivas de  $0^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $90^\circ$  e  $135^\circ$ , filtros e detectores de PMT envolvendo o jato em uma configuração Aninhada.

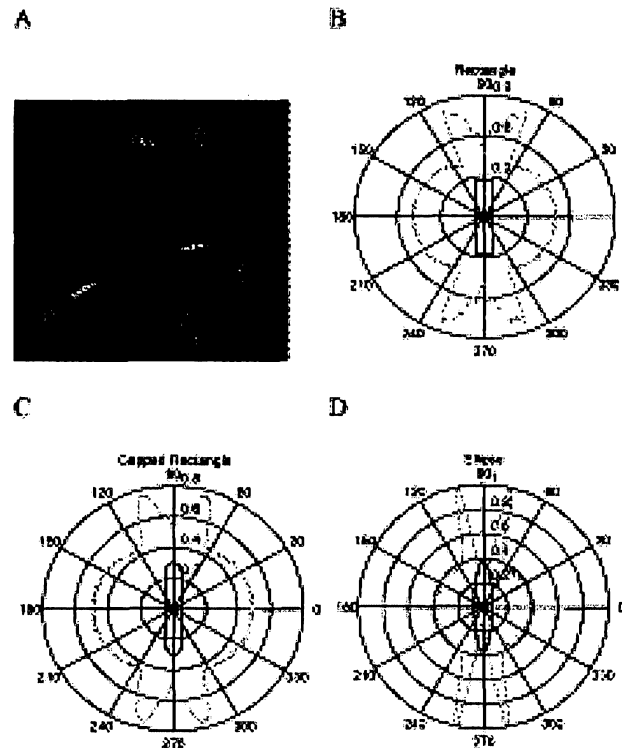


Fig.32. A: Imagem de esperma bovino manchado de Hoechst 33342 obtida em um microscópio de fluorescência mostrando células de 20 borda orientada e observador de face plana. Os resultados de simulação ótica de Monte Carlo optical (traço de raio) para intensidade de fluorescência de uma célula de esperma (eixo de fluxo na página) para várias geometrias incluindo B: retângulo, C: retângulo capeado, e D: geometrias elípticas, os

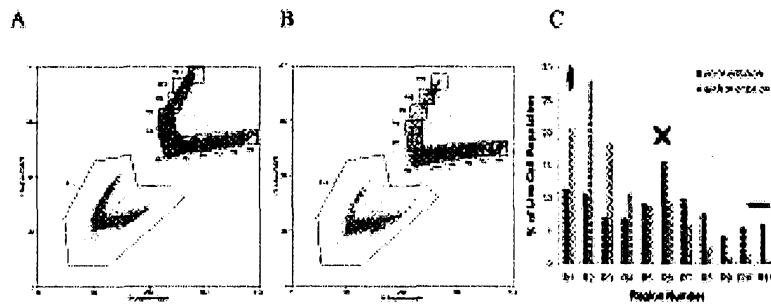


Fig.33. Efeito de orientação fluídica em células de esperma através do ponto de inspeção de um citômetro de fluxo. A: nenhuma orientação B: Orientação C: porcentagem de células que caem dentro de cada de 11 regiões de tamanho equivalente através de população de esperma vivo Sem e com orientation fluídica em uma taxa de evento de 35.000 eps.

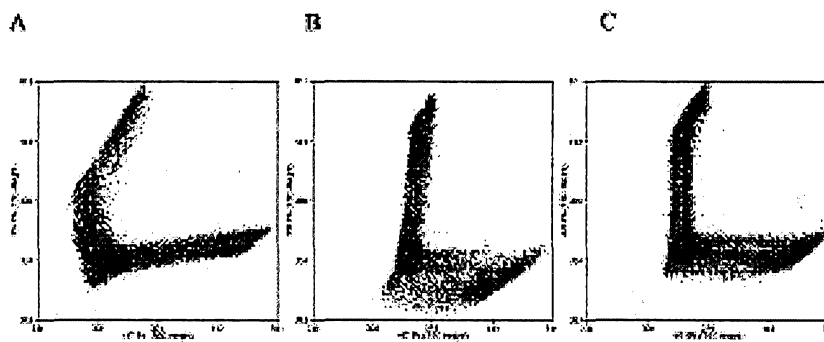


Fig. 34. Efeito do ângulo de iluminação em perfil de fluorescência de esperma  $0^\circ$  vs  $90^\circ$  com A: excitação  $0^\circ$  tradicional, B: excitação  $90^\circ$ , e C: excitação combinada  $0^\circ + 90^\circ$ . Uma função zoom foi usada para visualizar diferenças entre conjuntos de dados mais claramente.

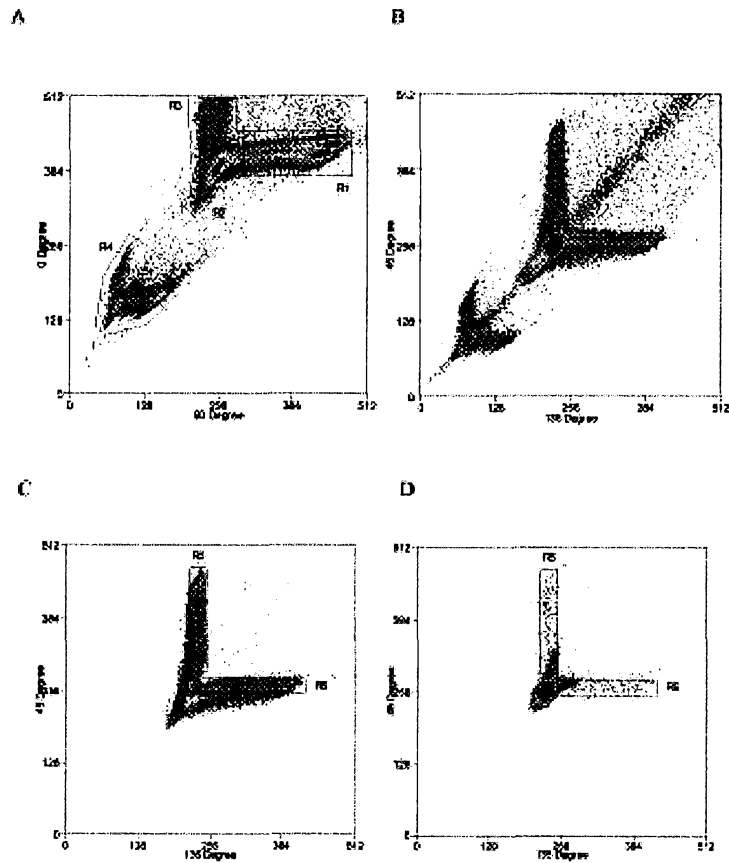


Fig.35. A análise de fluorescência de quad detector de 200000 células de esperma mostrando A: layout de fluorescência tradicional  $0^\circ$  vs  $90^\circ$  com orientação aumentada com relação a detector de  $90^\circ$  (R1),  $0^\circ$  10 (R3), entre (R2), e células mortas (R4), B: layout de detector  $45^\circ$  vs  $135^\circ$  de todas as células, C: células presas de R2 pertencentes àquelas orientadas de borda para  $45^\circ$  (R5) e  $135^\circ$  (R6) detectores respectivamente, e D: bivariado mostrando posição de células orientadas R1R1 conforme observado Usando-se par de detector  $45^\circ$ -  $135^\circ$ .

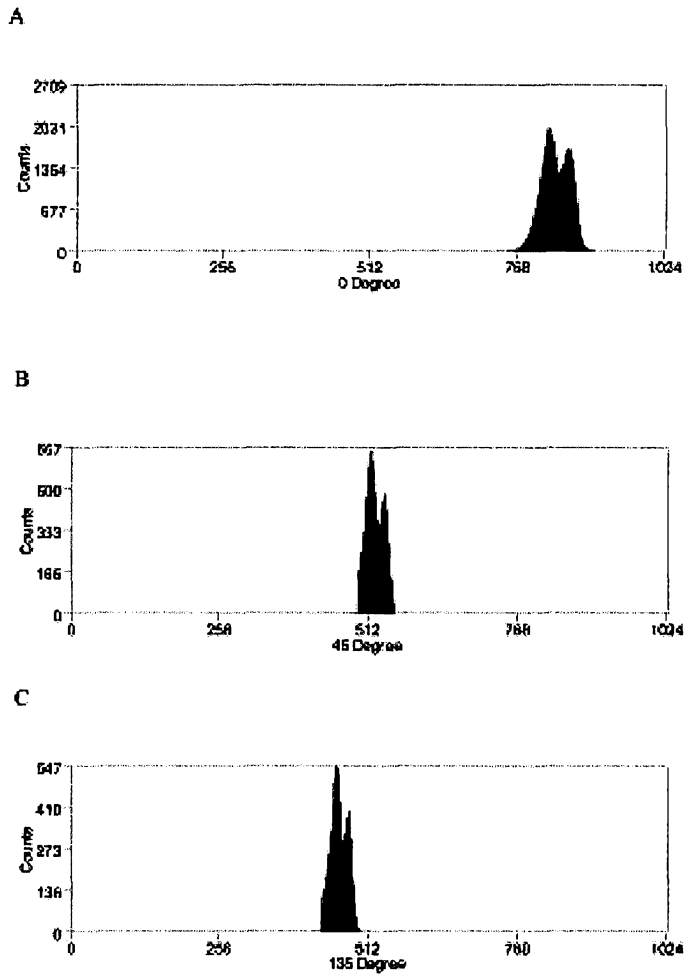


Fig.36. Histogramas de fluorescência para amostra adquirida na figura 35 mostrando uma divisão XY em cada de A: 0°, B: 45°, e C: 135° 5 detectores.

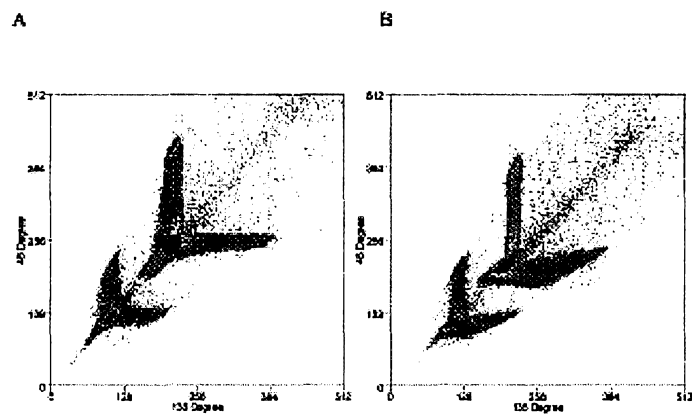


Fig.37. Iluminação de célula a A) 0°, e B) 45° com relação a par de detector de 45° e 135° mostrando dependência de orientação em excitação de célula ótima e medição de teor de DNA.