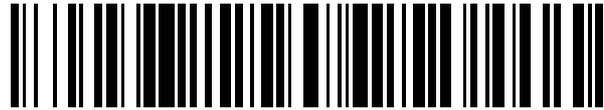


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 884**

51 Int. Cl.:

B03C 1/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2013** E 17208185 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019** EP 3326721

54 Título: **Eliminación magnética o identificación de células del esperma dañadas o comprometidas**

30 Prioridad:

29.08.2012 US 201261694756 P

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

30.04.2020

73 Titular/es:

**INGURAN, LLC (100.0%)
22575 State Highway 6 South
Navasota, TX 77868, US**

72 Inventor/es:

KRUG, KRISTIE MARIE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 757 884 T3

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

DESCRIPCIÓN

Eliminación magnética o identificación de células del espermatozoides dañadas o comprometidas

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES ASOCIADAS

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos nº 61/694,756 presentada el 29 de agosto de 2012.

ANTECEDENTES

10 Incrementar en una muestra el número o porcentaje de células viables de membrana intacta puede mejorar la calidad global de la muestra, y puede incrementar el éxito de procedimientos subsiguientes. Por ejemplo, un incremento en el número o porcentaje de espermatozoides viables de membrana intacta en una muestra reciente o congelada/descongelada puede mejorar la calidad global del espermatozoides. Las tasas de escisión tanto para procedimientos de fertilización in vitro como in vivo se pueden incrementar. La calidad del embrión se puede mejorar, y se pueden reducir pérdidas embrionarias, lo que puede conducir a mayores tasas de embarazo.

15 La separación celular magnética de espermatozoides apoptóticos se ha logrado usando anexina V. Sin embargo, es deseable eliminar células del espermatozoides y estructuras celulares del espermatozoides comprometidas, de maneras diferentes a las solamente apoptóticas. Además, la tecnología de anexina V puede estar limitada debido a que el amortiguador de unión puede afectar negativamente a la movilidad del espermatozoides. Además, el coste de los reactivos puede limitar potencialmente la aplicación clínica y adaptaciones rutinarias del protocolo para manipular mayores volúmenes y concentraciones celulares.

20 Said, T.M. y Land, J.A., Human Reproduction Update, 2011, Vol.17, nº 6, p. 719-733, describen diversos métodos magnéticos y electroforético para separar células de espermatozoides viables de las dañadas. Las partículas magnéticas en los métodos magnéticos se revisten con parejas de unión específicas para anexina V.

La presente solicitud aprecia que la manipulación celular magnética puede ser un esfuerzo desafiante.

SUMARIO

25 Como se describe, se proporciona una composición para la manipulación celular magnética. La composición puede incluir una pluralidad de partículas. Cada partícula en la pluralidad de partículas puede incluir un sustrato magnético. El sustrato magnético se puede caracterizar por una susceptibilidad magnética mayor que cero. Cada partícula en la pluralidad de partículas también puede incluir un compuesto que contiene silicio cargable. El compuesto que contiene silicio cargable puede revestir al menos una porción del sustrato magnético.

La invención se refiere a un método para la manipulación celular magnética como se define en las reivindicaciones.

30 El método puede incluir poner en contacto una composición con una muestra biológica para formar una mezcla. La composición puede incluir una pluralidad de partículas. Cada partícula en la pluralidad de partículas puede incluir un sustrato magnético. El sustrato magnético se puede caracterizar por una susceptibilidad magnética mayor que cero. Cada partícula en la pluralidad de partículas puede incluir un compuesto que contiene silicio cargable. El compuesto que contiene silicio cargable puede revestir al menos una porción del sustrato magnético. La muestra biológica puede incluir células y/o estructuras celulares. El método también puede incluir aplicar un campo magnético a la mezcla para manipular la composición.

35 Como se describe, se proporciona un kit para la manipulación celular magnética. El kit puede incluir instrucciones. Las instrucciones pueden incluir poner en contacto una composición con una muestra biológica para formar una mezcla. Las instrucciones también pueden incluir aplicar un campo magnético a la mezcla para manipular la composición. El kit también puede incluir la composición. La composición puede incluir una pluralidad de partículas. Cada partícula en la pluralidad de partículas puede incluir un sustrato magnético. El sustrato magnético se puede caracterizar por una susceptibilidad magnética mayor que cero. Cada partícula en la pluralidad de partículas puede incluir un compuesto que contiene silicio cargable. El compuesto que contiene silicio cargable puede revestir al menos una porción del sustrato magnético.

45 Objetos adicionales, ventajas y nuevas características de los métodos y procedimientos descritos se expondrán, en parte, en la descripción que sigue; y, en parte, serán manifiestos para los expertos en la técnica al examinar lo siguiente; o se pueden aprender por la práctica de los métodos y procedimientos descritos. Los objetos y ventajas de los métodos y procedimientos descritos se pueden realizar y obtener por medio de instrumentaciones y combinaciones señaladas particularmente, así como aquellos apartados mostrados por inferencia.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos que se acompañan, que se incorporan en y forman parte de la memoria descriptiva, ilustran una o más realizaciones de los métodos y procedimientos descritos en cuanto a células espermáticas, y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios celulares generales amplios de los métodos y procedimientos

descritos.

- La FIG. 1 muestra el análisis mediante citometría de flujo de una muestra de eyaculado antes y después del tratamiento de partículas magnéticas ejemplar para separar células de esperma muertas y que están muriendo de células de esperma viables en la muestra de eyaculado;
- 5 la FIG. 2 muestra los detalles del análisis del potencial zeta de partículas ejemplares descritas aquí según se resuspenden en amortiguador de almacenamiento a -28,2 mV;
- la FIG. 3 muestra los detalles del análisis del potencial zeta de partículas ejemplares descritas aquí según se resuspenden en amortiguador de almacenamiento a -22,4 mV;
- 10 la FIG. 4 muestra los detalles del análisis del potencial zeta de partículas ejemplares descritas aquí según se resuspenden en amortiguador TALP a -24,6 mV;
- la FIG. 5 muestra los detalles del análisis del potencial zeta de partículas ejemplares descritas aquí según se resuspenden en amortiguador MES a -16,5 mV;
- la FIG. 6 muestra los detalles del análisis del potencial zeta de partículas ejemplares descritas aquí según se resuspenden en dH₂O -26,6 mV; y
- 15 la FIG. 7 muestra los detalles del análisis del potencial zeta de partículas ejemplares descritas aquí según se resuspenden en amortiguador TRIS a -42,4 mV.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los métodos y procedimientos descritos pueden incluir una variedad de aspectos, que se pueden combinar de diferentes maneras y se pueden aplicar a diferentes células o materiales celulares. Las siguientes descripciones se proporcionan para enumerar elementos y describir algunas de las realizaciones de los métodos y procedimientos descritos. Estos elementos se dan con realizaciones iniciales y se muestran en ejemplos de una realización con respecto a esperma como un ejemplo inicial. Sin embargo, se debería entender que se puede aplicar de cualquier manera y en cualquier número todas y cada una de las permutaciones y combinaciones de todos los aspectos descritos para crear realizaciones adicionales de células o estructuras celulares adicionales. Los diversos ejemplos descritos y realizaciones preferida no se deberían interpretar que limitan los métodos y procedimientos descritos a solamente los sistemas, técnicas y aplicaciones descritos explícitamente. Además, esta descripción debería entenderse que apoya y engloba descripciones y reivindicaciones de todos los diversos realizaciones, sistemas, sustancias, elementos, técnicas, métodos, dispositivos, y aplicaciones con cualquier número de los elementos descritos, con cada elemento solo, y también con todas y cada una de las diversas permutaciones y combinaciones de todos los elementos en esta solicitud o cualquier solicitud subsiguiente.

Brevemente descritos, las realizaciones de los métodos y procedimientos descritos incluyen un método para eliminar o identificar células o estructuras celulares que tienen membranas dañadas de aquellas con membranas intactas, enriqueciendo de ese modo la muestra o la viabilidad celular. El método se puede aplicar a células tales como las contenidas en muestras recogidas recientemente, tras la dilución, durante y después del enfriamiento, o durante y después de otros procedimientos celulares o de sistemas que se pueden emplear antes de la crioconservación, o a muestras celulares congeladas/descongeladas. El método también se puede usar para muestras que se pueden usar inmediatamente. El método también se puede usar para muestras que se pueden mantener durante un período de tiempo o prolongadamente en amortiguadores u otras sustancias. Por ejemplo, el método también se puede usar para muestras que se pueden mantener a 4°C hasta 40°C durante al menos alrededor de 12, 24, 30, 36, 48, 60, 72 horas o más. El método también se puede usar para muestras que incluyen, pero no se limitan a, muestras que tienen una osmolaridad de 250 - 375 mOsm. Las poblaciones celulares enriquecidas se pueden usar para procedimientos rutinarios, antes o después de otras técnicas de procesamiento, antes o después del envío de las muestras, y antes o después de la crioconservación a largo plazo u otros procedimientos.

Las realizaciones relacionadas con esperma pueden incluir un método para eliminar esperma que tiene membranas dañadas de aquellos con membranas intactas, para enriquecer la viabilidad del esperma de una muestra de esperma. El método se puede aplicar a esperma contenido en eyaculados puros recientemente recogidos, tras la dilución, durante y después del enfriamiento, o durante y después de otros procedimientos de procesamiento del semen que se pueden emplear antes de la crioconservación, o esperma congelado/descongelado. El método también se puede usar para muestras puras o extendidas de esperma que se van a usar inmediatamente. El método también se puede usar para muestras de esperma puras o extendidas mantenidas hasta 30 h a 4°C hasta 40°C, o extendidas en amortiguadores ricos en esperma que tienen una osmolaridad de 250 - 375 mOsm. Las poblaciones de esperma enriquecidas se pueden usar para la inseminación artificial rutinaria, antes o después de técnicas de la separación por sexo del esperma, antes o después del envío del semen para fines de separación por sexos del esperma rutinarios o para fines de crioconservación, o para fertilización in vitro, para todo esperma de mamífero.

55 En algunas realizaciones, el daño a las membranas de células intactas se puede reducir eliminando efectos dañinos conocidos causados por células dañadas. Por ejemplo, la fragmentación del ADN, el daño oxidativo causado por

peroxidación, y la liberación prematura de enzimas proteolíticas e hidrolíticas pueden ser efectos atribuibles a daño de la membrana. El daño a la integridad de la muestra celular puede reducir la vida útil tanto in vitro como in vivo, puede reducir la capacidad funcional celular deseada, y puede provocar capacidades resultantes pobres.

5 Con respecto al espermatozoide como ejemplo no limitante, el daño a las membranas del espermatozoide intacto se puede reducir eliminando efectos dañinos conocidos causados por espermatozoide dañado. Por ejemplo, la fragmentación del ADN, el daño oxidativo causado por peroxidación, y la liberación prematura de enzimas proteolíticas e hidrolíticas pueden ser ejemplos de daño del espermatozoide causado por espermatozoide de membrana dañada. El daño a la integridad de los espermatozoos puede reducir la vida útil del espermatozoide tanto in vitro como in vivo, puede reducir la capacidad de fertilización, y probablemente provoque una mala calidad del embrión, que puede ser una fuente principal de infertilidad en mamíferos.

10 El espermatozoide de mamífero con buena fertilidad puede exhibir una elevada frecuencia de espermatozoide viable morfológicamente normal. Los procedimientos actuales para el procesamiento del semen para la selección de sexos, enfriamiento, o crioconservación, pueden tener efectos perjudiciales sobre el metabolismo y movilidad del espermatozoide, así como sobre el estado de los dominios de las membranas del espermatozoide. El resultado neto de estos efectos puede reducir la funcionalidad del espermatozoide. La eliminación magnética de células o estructuras celulares dañadas o comprometidas puede reducir un efecto perjudicial sobre la calidad de vida y el espermatozoide normal que puede ser causado por espermatozoide muerto y anormal.

15 El pH del medio que suspende a las células puede afectar a la carga de proteínas comprendidas en las células. Las proteínas pueden funcionar como iones dipolares, por ejemplo debido a la ionización de los diversos grupos R de los aminoácidos que constituyen su estructura primaria. El pH del medio puede afectar a las interacciones entre tales proteínas. Por ejemplo, la capacitación del espermatozoide puede incluir la eliminación de proteínas de revestimiento seminales absorbidas sobre la membrana superficial del espermatozoide. Se puede esperar que el incremento del pH del medio capacitante altere la unión de las proteínas a la superficie del espermatozoide. La alteración de la unión de las proteínas a la superficie del espermatozoide puede ser causa o puede estar asociada con la capacitación. Por ejemplo, el medio capacitante puede tener un pH de línea base entre alrededor de 6,5 y 8,5, o en algunos ejemplos entre alrededor de 7,2 y alrededor de 8,4. El medio capacitante puede incrementar en pH en asociación con o por causa de la capacitación exitosa. El incremento en el pH del medio capacitante en asociación con o en causalidad de la capacitación exitosa puede ser, en unidades de pH, al menos alrededor de 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, o 1. En algunos ejemplos, el incremento en el pH en asociación con o en causalidad de capacitación exitosa puede ser alrededor de 0,36 unidades de pH.

20 Los componentes iónicos del medio de cultivo pueden influir en la movilidad del espermatozoide de mamífero y en la capacidad del espermatozoide para penetrar un oocito. El pH del medio puede causar la ionización de sustancias en el medio, por ejemplo, incluyendo proteínas de membrana del espermatozoide intrínsecas, y proteínas de plasma seminal absorbidas extrínsecas. El pH del medio puede determinar muchos aspectos de la estructura y función de macromoléculas biológicas, incluyendo actividad enzimática, y el comportamiento de las células.

25 La carga neta en una superficie celular se puede ver afectada por el pH del entorno circundante, y puede hacerse más positiva o negativamente cargada debido a la pérdida o ganancia de protones. A un pH del espermatozoide fisiológico o casi fisiológico, la carga superficial neta puede ser negativa. Las membranas biológicas, incluyendo el espermatozoide, pueden estar negativamente cargadas en pH fisiológico, principalmente como resultado de la presencia de fosfolípidos ácidos. Alrededor de 10 – 20% de los lípidos de membrana totales pueden ser aniónicos. Debido a que la membrana puede exponerse al amortiguador acuoso circundante, se pueden producir interacciones específicas con componentes del medio exterior. Los grupos cargados de componentes de membrana e iones de disoluciones pueden estar implicados en los equilibrios resultantes. Los equilibrios se pueden ver afectados por diferentes factores y procesos que conducen a una variación de la densidad de carga de la superficie de membrana. La carga neta también se puede ver influida por la composición de la membrana, fuerza iónica de los electrolitos, y pH de la disolución.

30 El espermatozoide viable de mamífero puede tener una carga superficial negativa neta en la membrana del plasma. A medida que el espermatozoide sufre capacitación seguida de la reacción acrosómica, la carga neta puede hacerse menos negativa y más positiva. La carga neta se puede hacer menos negativa y más positiva debido, por ejemplo, a pérdida de grupos negativos, tales como grupos de ácido siálico. La capacitación se puede caracterizar por la eliminación de materiales de revestimiento de la superficie del espermatozoide. La capacitación puede ser la etapa penúltima en la fertilización, que da como resultado una mayor permeabilidad de la membrana plasmática a iones de Ca^{2+} , y que permite que el espermatozoide sufra la reacción acrosómica o la muerte si no se produce la fertilización. Un espermatozoide humano maduro viable puede tener un potencial zeta negativo de -16 a -20 mV (potencial diferencial entre la membrana del espermatozoide y sus alrededores), que puede disminuir con la capacitación hasta convertirse en más positivamente cargado o casi cero.

35 La precapacitación del espermatozoide puede dar como resultado la imposibilidad de fertilizar los óvulos. Además, el daño a la cromatina del espermatozoide puede dar como resultado una mala calidad del embrión. Puesto que la fertilización, como un ejemplo de muchas otras funciones celulares en esta clase, puede ser un suceso sensible al tiempo, y la buena calidad del embrión puede ser esencial para el desarrollo embrionario en el tiempo, ambos se pueden ver

afectados adversamente por la calidad del espermatozoides. Los factores liberados del espermatozoides dañado u otras células pueden ser en parte responsables del daño celular adicional a la población restante de células tal como espermatozoides normal. Por ejemplo, el espermatozoides muerto recientemente puede tener una capacidad de vida reducida del espermatozoides en semen bovino diluido. Además, el espermatozoides muerto recientemente eyaculado sometido a temperaturas elevadas antes de la eyaculación puede exhibir niveles de especies oxidativas muy reactivas. De este modo, el efecto tóxico de las células muertas, incluyendo, pero sin limitarse al espermatozoides, puede ser debido a actividad de aminoácido oxidasas. Las células muertas y anormales, tal como el espermatozoides, pueden tener efectos tóxicos en células de compañía. Las células muertas y anormales pueden reducir la funcionalidad de las muestras celulares tal como la fertilidad.

En diversas realizaciones de los métodos y procedimientos descritos, se pueden usar partículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilo y revestidas con silano, que oscilan en diámetro físico de 300 nm a 800 nm y un diámetro hidrodinámico promedio de alrededor de 330 nm. En algunas realizaciones, se pueden usar partículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilo y revestidas con silano sin ninguna manipulación superficial adicional, puesto que el grupo carboxilo en el silano contribuye a que las partículas tengan una carga eléctrica o potencial zeta negativo neto. El espermatozoides puede aumentar en pH intracelular con la capacitación, que puede hacer que la membrana del espermatozoides capacitado y muerto pierda potencial zeta negativo neto y se desplace hacia un potencial zeta neutro (cero) o más positivo. Las partículas magnéticas cargadas negativamente se pueden unir específicamente a espermatozoides comprometido, dañado, o muerto. Además, la superficie de silano también se puede conjugar a otras sustancias, tal como mediante química estándar de EDC/NHS. En algunos ejemplos, la eficiencia del acoplamiento mediado por EDC se puede incrementar añadiendo la presencia de sustancias tales como ésteres reactivos de amina, para la conversión de grupos carboxilo en aminas.

En diversas realizaciones, los procedimientos y métodos descritos se pueden usar para diferenciar células necróticas, apoptóticas y normales. En el ejemplo discutido, la superficie de silano modificada con carboxilo se une a la membrana del espermatozoides muerto y que está muriendo a través de una interacción de cargas eléctricas conocida como potencial zeta. El material puede adquirir espontáneamente una carga eléctrica superficial positiva o negativa cuando se pone en contacto con un medio polar (por ejemplo, agua). Por ejemplo, una interfaz en agua desionizada puede estar cargada negativamente. Se puede observar una ionización de grupos superficiales para formar una carga eléctrica superficial con superficies de óxidos metálicos (M-OH) así como con materiales que pueden contener grupos carboxilo y/o amino, tales como proteínas, polímeros iónicos, y polielectrolitos. La ionización y/o disociación, el grado de desarrollo de carga, la carga molecular neta, y el signo, ya sea positivo o negativo, pueden depender del pH del medio circundante.

La conjugación de partículas magnéticas funcionalizadas con un grupo carboxilo se puede aplicar adicionalmente a, por ejemplo, colorantes fluorescentes. SYBR-14 y bis-bencimida son colorantes permeables de membrana ejemplares que se pueden usar para distinguir células de otras sustancias de fondo. En la realización de células del espermatozoides, tales colorantes fluorescentes pueden distinguir células de espermatozoides de partículas diluyentes encontradas frecuentemente en extendedores empleados en almacenamiento no congelado o en criopreservación de espermatozoides. Otros ejemplos de sondas fluorescentes pueden incluir JC-1 y rodamina 123, que se pueden usar para evaluar la tasa de respiración de mitocondrias celulares; o aglutininas marcadas fluorescentemente del guisante (PSA) o del cacahuete (PNA), que se pueden usar para detectar células que han reaccionado acrosómicamente tales como espermatozoides. Otros marcadores incluyen, pero no se limitan a, naranja de acridina (por ejemplo, para eliminar células apoptóticas); 7-aminoactinomicina D (7-AAD), que también puede ser un agente intercalante del ADN en ADN bicatenario con una afinidad elevada por regiones ricas en GC; colorantes alimentarios tales como Rojo Allura (FD&C Red #40), Amarillo Sunset (FD&C Yellow #6), Índigo carmín (FD&C Blue #2), y Fast Green FCF (FD&C #3).

La membrana plasmática de las células puede cubrir toda la célula, y puede tener distintos compartimentos de membrana, tales como, en el ejemplo de la célula de espermatozoides, las porciones de cabeza, central y principal. Puesto que la membrana plasmática también puede estar compuesta de distintos compartimentos de membrana, se pueden usar diferentes colorantes, solos o en combinación con otros colorantes, para evaluar la integridad de los diferentes compartimentos de membrana plasmática.

En algunas realizaciones de los métodos y procedimientos descritos, las células con grados variables de daño de membrana se pueden marcar con partículas magnéticas que contienen una superficie cargada. Esto puede contrastar con el uso de procedimientos de clasificación celular magnéticos con anexina V/microperlas, que no identifican y/o eliminan espermatozoides precapacitado o que ha reaccionado acrosómicamente, debido a que PS no se externaliza en estos ejemplos. Cuando el espermatozoides o estructuras celulares dañadas en la membrana, marcadas con perlas magnéticas cargadas superficialmente, se colocan en un campo magnético, tales células o estructuras celulares se pueden eliminar de la población general. La subpoblación cosechada resultante de células viables, quizás tal como espermatozoides, se puede procesar además para criopreservación, transporte y almacenamiento sin congelar, utilización funcional (tal como selección del sexo para el espermatozoides), o se puede usar en aspectos relacionados, quizás tal como tecnologías reproductivas asistidas (ARTs) para espermatozoides o similar.

Las realizaciones de los métodos y procedimientos descritos se pueden usar con cualquier tipo de aparato separador que identifica magnéticamente, incluyendo, pero sin limitarse a, dispositivos que incorporan columnas, tales como productos de clasificación celular activada magnéticamente (MACS), dispositivos que usan campos magnéticos simples aplicados a tubos de ensayo o recipientes, o dispositivos magnéticos de alto rendimiento.

- Las células muertas y que mueren seleccionadas, marcadas con partículas magnéticas y sometidas a separación celular magnética en un sistema magnético abierto sin columna, se pueden eliminar más eficientemente y en mayor número por unidad de tiempo en comparación con la citometría de flujo. La separación celular magnética se puede utilizar sin presión operante interna, o si se somete a presión, una presión operante interna menor; y se puede evitar que la corriente de fluido que contiene las células se rompa en gotitas que dañan a las células, como en citometría de flujo. Además, el fluido de la funda para la citometría de flujo puede ser generalmente un medio fisiológico a base de sales, deficiente en lipoproteínas. La separación celular magnética puede permitir que algunas células, tal como esperma, se bañen en amortiguadores ricos en nutrientes que promueven y prolongan la viabilidad celular durante el procedimiento de separación.
- Los métodos y procedimientos descritos pueden eliminar células o estructuras celulares necróticas que se han traumatizado durante procedimientos de procesamiento celular tales como crioconservación, centrifugación, y tinción. El daño necrótico se puede producir por procesos celulares diferentes de los causados en un ejemplo por senescencia del esperma, que puede ser una causa de origen natural de la muerte celular.
- En otras aplicaciones de separación celular magnética, se pueden usar realizaciones de los métodos y procedimientos descritos para marcar células de forma única, tal como esperma, con uno o más colorantes fluorocromos, dirigidos a un atributo celular o del esperma específico. La célula o célula de esperma seleccionada se puede exterminar selectivamente o se puede hacer no funcional, con una fuente energética, incluyendo, pero sin limitarse a, una carga eléctrica o pulso de luz láser. Los métodos y procedimientos descritos se pueden usar para marcar magnéticamente y finalmente eliminar la célula o esperma no funcional a través de procedimientos de separación celular magnética. La subpoblación deseada resultante de células cosechadas se puede seleccionar para la integridad (viabilidad), así como para atributos celulares específicos, incluyendo, pero sin limitarse a, en el ejemplo del esperma, selección del sexo cromosómico.
- En diversas realizaciones, se proporciona una composición para la manipulación celular magnética. La composición puede incluir una pluralidad de partículas. Cada partícula en la pluralidad de partículas puede incluir un sustrato magnético. El sustrato magnético se puede caracterizar por una susceptibilidad magnética mayor que cero. Cada partícula en la pluralidad de partículas también puede incluir un compuesto que contiene silicio cargable. El compuesto que contiene silicio cargable puede revestir al menos una porción del sustrato magnético.
- “Susceptibilidad magnética” significa la respuesta de una muestra, tal como el sustrato magnético, a un campo magnético aplicado externamente. Por ejemplo, una susceptibilidad magnética menor o igual a cero puede asociarse a diamagnetismo. Una susceptibilidad magnética mayor que cero puede asociarse con propiedades magnéticas distintas del diamagnetismo. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el sustrato magnético se puede caracterizar por uno o más de paramagnetismo, superparamagnetismo, ferromagnetismo, o ferrimagnetismo. El sustrato magnético puede incluir un óxido metálico, tal como un óxido de metal de transición, por ejemplo un óxido de hierro. En algunos ejemplos, el sustrato magnético puede incluir Fe_3O_4 .
- Un “compuesto que contiene silicio cargable” es cualquier molécula, polímero o material que contenga silicio, que se puede hacer que adquiera o retenga una carga, por ejemplo vía funcionalización con restos cargados o cargables. Los restos cargables/cargados pueden incluir, pero no se limitan a, especies (y sus iones) de: metales; óxidos; carboxilatos; aminas; amidas; carbamidas; sulfatos; sulfonatos; sulfitos; fosfonatos; fosfatos; haluros; hidróxidos; y sus combinaciones. Por ejemplo, el compuesto que contiene silicio cargable puede incluir 2-(carbometoxi)etiltrimetoxisilano.
- En diversos ejemplos, la composición puede incluir una carga potencial zeta. Por ejemplo, el compuesto que contiene silicio cargable puede incluir una carga de potencial zeta negativa. El compuesto que contiene silicio cargable puede incluir una carga de potencial zeta positiva. En algunos ejemplos, al menos una porción de la pluralidad de partículas puede incluir una primera carga de potencial zeta. La porción de la pluralidad de partículas puede formar un complejo con una o más células o estructuras celulares que incluyen una segunda carga de potencial zeta. La segunda carga de potencial zeta puede ser opuesta en signo en comparación con la primera carga de potencial zeta. En varias realizaciones, al menos una porción de la pluralidad de partículas puede incluir una carga de potencial zeta negativa. La porción de la pluralidad de partículas puede formar un complejo con una o más células o estructuras celulares de esperma que incluye una carga de potencial zeta positiva.
- En diversas realizaciones, la pluralidad de partículas puede incluir al menos uno de una proteína, un anticuerpo, y un tinte. La proteína, anticuerpo o tinte se pueden conjugar al compuesto que contiene silicio cargable. Por ejemplo, el compuesto que contiene silicio cargable puede incluir 2-(carbometoxi)etiltrimetoxisilano, y la proteína, anticuerpo o tinte se puede conjugar al grupo 2-(carbometoxi), por ejemplo vía un enlace de amida.
- En otra realización, se proporciona un método para la manipulación celular magnética. El método puede incluir poner en contacto una composición con una muestra biológica para formar una mezcla. La composición puede incluir una pluralidad de partículas. Cada partícula en la pluralidad de partículas puede incluir un sustrato magnético. El sustrato magnético se puede caracterizar por una susceptibilidad magnética mayor que cero. Cada partícula en la pluralidad de partículas puede incluir un compuesto que contiene silicio cargable. El compuesto que contiene silicio cargable puede revestir al menos una porción del sustrato magnético. La muestra biológica puede incluir células y/o

estructuras celulares. El método también puede incluir aplicar un campo magnético a la mezcla para manipular la composición.

5 Una "muestra biológica" puede incluir cualquier composición natural o preparada que incluya las células y/o estructuras celulares. Las muestras naturales pueden incluir, por ejemplo, fluidos biológicos que contienen células o estructuras celulares, tales como sangre, fluidos linfáticos, fluidos intestinales, fluidos intercelulares, sudor, lágrimas, orina, semen, secreciones mucosales, fluido sinovial, y similares. Las muestras naturales pueden incluir fluidos típicamente libres de células o estructuras celulares, pero que pueden incluir células o estructuras celulares como parte de lesión, dolencia, defecto genético, u otras condiciones patológicas. Las muestras preparadas pueden incluir cualquier biopsia, homogenado tisular, u otra forma preparada de tejido biológico. Típicamente, la muestra biológica
10 incluirá al menos una célula o estructura celular caracterizada por una carga de potencial zeta. La muestra biológica puede incluir al menos dos o más células o estructuras celulares caracterizadas por cargas de potencial zeta que difieren en signo o densidad de carga. Por ejemplo, una muestra biológica puede incluir una primera célula caracterizada por una primera carga de potencial zeta y una segunda célula caracterizada por una segunda carga de potencial zeta, opuesta en signo a la primera carga de potencial zeta.

15 En algunas realizaciones, el método puede incluir hacer que el compuesto que contiene silicio cargable adquiera una primera carga de potencial zeta. La primera carga de potencial zeta puede ser opuesta en signo en comparación a una segunda carga de potencial zeta comprendida por las células y/o estructuras celulares en la muestra biológica. Causar que el compuesto que contiene silicio cargable adquiera la primera carga de potencial zeta puede incluir poner en contacto el compuesto que contiene silicio cargable con un medio polar, como se describe aquí.

20 En diversas realizaciones, el método puede incluir causar que la composición y al menos una porción de las células y/o estructuras celulares en la muestra biológica formen un complejo. Aplicar el campo magnético a la mezcla para manipular la composición puede manipular el complejo.

En algunas realizaciones, al menos una porción de la pluralidad de partículas comprende además al menos uno de una proteína, un anticuerpo, y un tinte.

25 En diversas realizaciones, la muestra biológica puede incluir células viables y células o estructuras celulares dañadas o comprometidas. La composición puede formar selectivamente un complejo con una de las células viables o las células dañadas o comprometidas, por ejemplo según una primera carga de potencial zeta en la composición y una segunda carga de potencial zeta opuesta en una de las células viables o las células o estructuras celulares dañadas o comprometidas. El método puede incluir además separar las células viables de las células y/o estructuras celulares dañadas o comprometidas mediante aplicación del campo magnético a la mezcla. Debido a que la composición puede formar selectivamente un complejo con una de las células viables o las células o estructuras celulares dañadas o comprometidas, la porción de la muestra biológica que forma el complejo con la composición se puede manipular magnéticamente y separar de porciones de la muestra biológica que no forman el complejo con la composición. El método puede ser por lo tanto un método para separar selectiva y magnéticamente porciones de la
30 muestra biológica según la carga de potencial zeta.

35 En diversas realizaciones, la muestra biológica puede incluir células de esperma o estructuras celulares de esperma viables y células de esperma dañadas o comprometidas. La composición puede formar un complejo con las células de esperma dañadas o comprometidas o con las células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas. El método puede incluir además separar las células de esperma viables del complejo que incluye las células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas, aplicando el campo magnético a la mezcla. Debido a que la composición puede formar selectivamente un complejo con las células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas, el complejo con las células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas se puede manipular magnéticamente y separar de las células de esperma viables. El método puede ser por lo tanto un método para separar selectiva y magnéticamente células de esperma viables de células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas, según la carga de potencial zeta.

En diversas realizaciones, el método puede incluir someter la muestra de esperma a detección, por ejemplo detección por fluorescencia como se describe aquí.

40 En diversas realizaciones, se proporciona un kit para la manipulación celular magnética. El kit puede incluir instrucciones. Las instrucciones pueden incluir poner en contacto una composición con una muestra biológica para formar una mezcla. Las instrucciones también pueden incluir aplicar un campo magnético a la mezcla para manipular la composición. El kit también puede incluir la composición. La composición puede incluir una pluralidad de partículas. Cada partícula en la pluralidad de partículas puede incluir un sustrato magnético. El sustrato magnético se puede caracterizar por una susceptibilidad magnética mayor que cero. Cada partícula en la pluralidad de partículas puede incluir un compuesto que contiene silicio cargable. El compuesto que contiene silicio cargable puede revestir al menos una porción del sustrato magnético.
45

En algunas realizaciones del kit, la muestra biológica puede incluir células viables y células o estructuras celulares dañadas o comprometidas. La composición puede formar un complejo con una de las células viables o las células o

estructuras celulares dañadas o comprometidas. Las instrucciones pueden incluir además separar las células viables de las células o estructuras celulares dañadas o comprometidas, aplicando el campo magnético a la mezcla.

5 En varias realizaciones del kit, la composición se puede configurar para formar un complejo con células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas. Las instrucciones pueden incluir además seleccionar la muestra biológica que comprende células de esperma viables y células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas. Las instrucciones también pueden incluir separar las células de esperma viables del complejo que incluye las células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas, aplicando el campo magnético a la mezcla.

10 Habiendo descrito de forma general el presente método, en los siguientes EJEMPLOS se pueden presentar más detalles del mismo. Aunque los ejemplos implican células de esperma como el aspecto celular, la selección o aplicación no está destinada a limitar el alcance de los métodos y procedimientos descritos, ya que otros tipos de células son valiosos en aplicaciones de la enseñanza general de los métodos y procedimientos descritos.

EJEMPLO 1: Preparación de partículas para la tinción magnética de células muertas/dañadas con esperma como ejemplo representativo no limitante. Núcleos magnéticos: Los núcleos magnéticos se pueden fabricar tal como mediante coprecipitación de Fe_3O_4 con Fe_2O_3 , de manera que la susceptibilidad magnética de las partículas en un campo magnético escogido pueda ser suficientemente elevada para proporcionar una separación rápida de células marcadas magnéticamente de las células no marcadas. El núcleo puede estar compuesto de cualquier material magnético; los ejemplos no limitantes posibles incluyen: (1) ferritas tales como magnetita, ferrita de cinc, o ferrita de manganeso; (2) metales tales como hierro, níquel, o cobalto; y (3) dióxido de cromo. En una realización, los núcleos de hierro están compuestos de magnetita (Fe_3O_4). En otras realizaciones, el núcleo se puede extender para incluir sustancias tales como materiales de nanopartículas a base de óxido de hierro, incluyendo materiales compuestos que tienen la estructura general MFe_2O_4 (en la que M puede ser Co, Ni, Cu, Zn, Mn, Cr, Ti, Ba, Mg, o Pt).

25 De este modo, en este un ejemplo no limitante, una cámara de reacción que contiene 400 ml de dH_2O en una tetera de agua se calentó hasta 60°C . A los 400 ml de dH_2O calentada, se añadieron 23,4 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 8,6 g de FeCl_2 o similar, y la mezcla se agitó bajo N_2 gaseoso. A esta disolución, se añadieron 30 ml de $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 25%, y el mezclamiento se continuó bajo N_2 gaseoso. Casi inmediatamente, la mezcla salina naranja se convirtió en una disolución marrón oscura/negra. El calor se apagó, y la suspensión ferrofluidica se dejó enfriar mientras se agitaba vigorosamente durante 30 min. El precipitado se recogió magnéticamente, y el sobrenadante se decantó. Al ferrofluido recogido magnéticamente se añadieron 800 ml de dH_2O , se arremolinó, y se repitió el procedimiento de recogida magnética. El procedimiento de lavado se repitió cuatro veces para eliminar sustancialmente todo el $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ residual y cualesquiera partículas no magnéticas. La etapa de lavado final puede incluir una disolución de 800 ml de NaCl 0,02 M en dH_2O o similar. Los tamaños de núcleos de hierro recogidos estaban entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 nm.

35 Revestimiento de núcleos de hierro con una superficie funcionalizable: La capa externa final puede comprender un revestimiento polimérico que interacciona con el entorno acuoso y sirve como un sitio de unión para proteínas y ligandos. Los polímeros adecuados pueden incluir polisacáridos, alquilsilanos, polímeros biodegradables tales como, por ejemplo, poli(ácidos lácticos) (PLA), policaprolactona (PCL), y polihidroxitbutirato-valerato (PHBV); materiales compuestos, y poliolefinas tales como polietileno en sus diferentes variantes. Más específicamente, las cadenas de polisacárido pueden incluir dextranos, arabinogalano, pululano, celulosa, celobiosa, inulina, quitosano, alginatos, y ácido hialurónico. Para encapsular el núcleo magnético, también se pueden emplear compuestos que contienen silicio tales como alquilsilanos. Los alquilsilanos adecuados para realizaciones de los métodos y procedimientos descritos pueden incluir, pero no se limitan a, n-octiltrietoxisilano, tetradeciltrimetoxisilano, hexadeciltrimetoxisilano, hexadeciltrimetoxisilano, hexadeciltriacetoxisilano, metilhexadecildiacetoxisilano, metil-hexadecildimetoxisilano, octadeciltrimetoxisilano, octadeciltriclorosilano, octadeciltriacetoxisilano, y 1,12-bis(trimetoxisilil)dodecano. En un ejemplo, la relación de hierro a revestimiento de compuesto que contiene silicio puede ser aproximadamente 0,2. En otras realizaciones, la relación de hierro a revestimiento de compuesto que contiene silicio puede ser mayor que alrededor de 0,2, tal como alrededor de 0,4 o 0,8, con vistas a revestir completamente los núcleos de hierro, de manera que los núcleos de hierro se pueden eliminar de la suspensión celular con el campo magnético. Las partículas subrevestidas pueden dar como resultado cristales de óxido metálico libres, que pueden ser perjudiciales para la viabilidad celular. En todavía otras realizaciones, la relación de hierro a revestimiento de compuesto que contiene silicio puede ser menor que 0,2. De hecho, la concentración de hierro dividida entre la concentración de compuesto que contiene silicio puede ser de alrededor de 0,1 a alrededor de 1.

55 Para los ejemplos de eliminación magnética de células muertas/que mueren o comprometidas, tal como esperma, se puede usar un compuesto que contiene silicio para encapsular los núcleos de hierro.

60 El precipitado del núcleo de hierro se puede dejar sedimentar. Entendiendo que a lo largo de esta descripción todas las cantidades, tiempos y valores se pueden variar hacia arriba o hacia abajo, tal como en 10%, 20%, 30%, o incluso 40%, en cualquier permutación o combinación para algunas realizaciones, se añadieron 67,1 mg del ferrofluido a 100 ml de 2-(carbometoxi)etiltrimetoxisilano al 10%. 2-(carbometoxi)etiltrimetoxisilano es aún otro ejemplo de un compuesto que contiene silicio que es adecuado para uso en los métodos y procedimientos descritos como un

revestimiento de compuesto que contiene silicio. El pH se ajustó a 4,5 usando ácido acético glacial > 99,5%, y la suspensión se hizo reaccionar a 70°C durante 2 h bajo N₂ gaseoso con mezclado vigoroso. Tras enfriar, las partículas se pueden recoger magnéticamente y lavar con dH₂O. Después de lavar, las nanopartículas magnéticas revestidas con silano se pueden suspender en 5 ml de amortiguador de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) amortiguador TRIS, amortiguador TALP, 0,05 M, o puede permanecer en el dH₂O hasta el uso para la separación. El amortiguador de resuspensión puede estar a un pH que retiene o crea un potencial zeta negativo neto de las partículas.

La concentración de hierro se puede determinar usando espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), y la concentración de hierro se puede ajustar de acuerdo con miligramos por mililitro necesarios para la eliminación óptima de células muertas. Las partículas pueden tener un diámetro hidrodinámico promedio de 300 nm, y necesitan estar en un intervalo de 300 a 1000 nm para permanecer suspendidas en disolución de manera que la interacción máxima entre las células y las partículas se logra manteniendo las partículas en suspensión y no sedimentándolas debido a tamaños más grandes.

Acoplamiento de proteínas y ligandos a las superficies de las partículas: En el caso de que la superficie de las partículas necesiten ser tratadas y conjugadas a una proteína o anticuerpo, se pueden usar los siguientes métodos. El tratamiento de dextrano y otros polímeros con peryodato es un método para la unión de proteínas, debido en gran medida al gran número de grupos reactivos que están disponibles para la modificación. El tratamiento suave con peryodato sódico puede crear grupos aldehído reactivos mediante oxidación de grupos hidroxilo o dioles adyacentes. Las proteínas, anticuerpos, estreptavidina, ácidos nucleicos modificados con amino, se pueden añadir a pH elevado para permitir que las aminas formen bases de Schiff con los aldehídos. Los enlaces se pueden reducir subsiguientemente a enlaces de amina secundaria estables mediante tratamiento con borohidruro sódico o cianoborohidruro sódico, que puede reducir los grupos aldehído sin reaccionar a alcoholes. Otro método para acoplar proteínas a las nanopartículas magnéticas puede ser crear enlaces de hidrazina estables. Por ejemplo, una proteína se puede acoplar a dextrano usando la hidrazona de acetona de 4-hidrazinonicotinato de succinimidilo (SANH; Solulink Inc, San Diego, CA). La reacción puede usar cinco veces menos proteína, y la densidad de proteína resultante puede ser tan alta como con otros métodos. El reactivo SANH puede permitir un acoplamiento más eficiente y suave de ligandos a la superficie de dextrano. La unión del ligando sobre nanopartículas magnéticas revestidas con sílice se puede completar usando (3-aminopropil)trióxosilano (APTS), para introducir aminas en la superficie de las partículas, mientras que (3-mercaptopropil)trióxosilano (MPTMS) introduce grupos SH. Entonces se puede usar el agente de acoplamiento heterobifuncional (4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) para enlazar tioles a las aminas. Como ejemplos, las aminas en la superficie de las partículas se pueden enlazar a tioles en moléculas de estreptavidina, y los tioles en la superficie de las partículas se pueden enlazar a aminas en estreptavidina. Hay varios métodos para reticular proteínas a través de modificaciones químicas conocidas en la técnica que se pueden usar para las presentes realizaciones de los métodos y procedimientos descritos. Para este ejemplo, el silano funcionalizado con ácido carboxílico se puede unir a proteínas y ligandos a través de química de EDC.

Activación mediante EDC de grupos COOH en la activación de superficies de partículas: Las partículas silanizadas se resuspendieron en amortiguador de MES 0,05 M, se recogieron magnéticamente, y el sobrenadante se puede aspirar y desechar. Se añadieron a las partículas otros 5 ml de amortiguador de MES (0,05 M, pH 4,7 - 5,2) por 10 mg de hierro, y la suspensión se agitó vigorosamente. Las partículas se recogieron magnéticamente, y el sobrenadante se aspiró y se desechó. Esta etapa se puede repetir dos o más veces adicionales. La EDC congelada se dejó descongelar a temperatura ambiente durante 30 min. La EDC (también conocida como EDAC o EDCI, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), obtenida habitualmente como un hidrocloreto, es una carbodiimida soluble en agua, que se emplea típicamente a pH en el intervalo entre 4,0 y 6,0. La EDC se puede usar como un reticulador químico para colágeno, reaccionando con los grupos ácido carboxílico del polímero de colágeno, que entonces se puede enlazar al grupo amino en la mezcla de reacción.

Se añadieron 1,6 mg de EDC/mg de hierro a la suspensión de partículas, y la suspensión se agitó vigorosamente. Cada tubo o similar que contiene partículas y EDC se colocó en un agitador de balanceo de laboratorio a temperatura ambiente durante 30 min. Después de 30 min., las partículas se recogieron magnéticamente, y el sobrenadante se aspiró y se desechó. Para la conjugación de las proteínas a las diversas superficies, se pueden usar amortiguadores de concentraciones salinas variables, molaridades, incluyendo, pero sin limitarse a, 0,1 M a 1 M, e intervalos de pH de 10 a 4,7. La función de cada anticuerpo, proteína y ligando se optimiza a diferentes intervalos de pH y molaridades, como es sabido en la técnica (Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2008). En este ejemplo, el pelete de la partícula se añadió a amortiguador de MES 0,05 M, las partículas se pueden recoger magnéticamente, y el sobrenadante se puede aspirar y desechar. Esta etapa se puede repetir tres o más veces. Se suspendieron 10 mg de proteína, ligando o colorante en amortiguador de MES 0,05 M, y se añadieron a las partículas de manera que el volumen marcador total fue alrededor de 5 ml por 10 mg de hierro.

Para la reacción de acoplamiento, se usó una balanza estequiométrica de 1 mg de proteína, ligando, o colorante por 1 mg de hierro. Algunos experimentos sugirieron que la mejor unión de las células muertas o comprometidas depende de la concentración, y puede ocurrir en alrededor de esta concentración (por supuesto, con las variaciones de porcentajes anteriores aplicables). El intervalo en anticuerpo o proteína usada puede incluir, pero no se limita a, 0,125 mg a 5 mg de anticuerpo por mg de hierro. Los tubos se agitaron y se colocaron en un agitador de balanceo

- de laboratorio a temperatura ambiente durante 24 h, y las partículas se recogieron magnéticamente. El sobrenadante se aspiró y se desechó. Cada suspensión de partículas se suspendió en 5 ml de amortiguador de MES. A cada tubo, se añadieron 5 ml de disolución de paralización (glicina 1M, pH 8,0), y los tubos se agitaron vigorosamente. Las disoluciones de paralización pueden incluir, pero no se limitan a, 2-mercaptoetanol, etanolamina, glicina, exposición a UV, exclusión por tamaños y recogida magnética. Cada tubo se colocó en un agitador de balanceo de laboratorio durante 30 min. a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se añadieron 5 ml de amortiguador de lavado a cada tubo, y se agitaron para mezclarlos. Las partículas se separaron magnéticamente, y el sobrenadante se aspiró y se desechó. Esta etapa se puede repetir 4 o más veces. Después de que el procedimiento de conjugación se terminó, las partículas se recogieron magnéticamente, se lavaron, y se filtraron para obtener una distribución de tamaños de 50 a 400 nm. Después de las etapas de lavado, cada suspensión de partículas se suspendió en un amortiguador para las células particulares, tales como para células de esperma u otras de tales células, con un pH (6,0 – 8,0) y osmolaridad (250 – 350) adecuados para la viabilidad óptima de las células espermáticas o de otras células, tal como, pero sin limitarse a, disolución de TRIS, disolución de citrato de sodio, disolución de TEST, yema de huevo-TRIS (pH 6,5 – 7,4), yema de huevo-citrato sódico (pH 6,5 – 7,4), yema de huevo-TEST (pH 6,5 – 7,6), extendedores de la leche (pH 6,5 – 7,4), extendedores comercialmente disponibles comercializados por IMV International, Maple Grove, MN, USA y MiniTube GmbH, Verona, WI, USA, y medios químicamente definidos, que incluyen, pero sin limitarse a, TALP (pH 6,0 - 8,0), Tyrodes (pH 6,0 - 8,0) y Hepes BGM-3 (pH 6,0 - 8,0), de forma que la concentración de trabajo resultante de hierro fue alrededor de 4 mg/ml según se confirmó mediante espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).
- Las partículas pueden ser ventajosamente del orden de alrededor de 300 nm, de manera que se maximiza en disolución la interacción entre las partículas y la de las células dañadas o muertas. Si las partículas son demasiado grandes, tal interacción puede no ocurrir debido al efecto de sedimentación de las partículas de mayor tamaño en disolución. Si las partículas son menores que aproximadamente 30 nm, pueden no ser suficientemente magnéticas y se tendrán que generar materiales nucleares de mayor susceptibilidad magnética en un campo de energía magnética escogido, o estas pequeñas partículas pueden contribuir a la unión no específica, esto es, se pueden unir a células viables así como a células muertas y que están muriendo. Si la unión no específica relacionada con el tamaño de partículas es problemática, el tamaño de partículas se puede incrementar, o se puede añadir a la disolución de amortiguador marcador un agente de bloqueo que depende de las células particulares implicadas, tal como leche deshidratada desnatada o seroalbúmina para esperma, para minimizar tal unión no específica.
- Las partículas cargadas en su superficie, usadas en los Ejemplos 2-4, comprenden Fe_3O_4 revestido con 2-(carbometoxi)etiltrimetoxisilano, sin activación o funcionalización posterior. La relación de hierro a revestimiento de compuesto que contiene silicio es aproximadamente 0,2.

EJEMPLO 2: Eliminación de células dañadas.

- Eliminación de esperma muerto y que está muriendo de una muestra de semen crioconservada descongelada. Seis pajuelas de semen se obtuvieron de nitrógeno líquido y se descongelaron en un baño de agua durante 2 min. Los contenidos de las seis pajuelas se vaciaron en un tubo falcon de 50 ml (alrededor de 240 millones de esperma). Se añadieron alrededor de 10 ml de fluido envolvente bovino, y las células se hicieron girar durante 7 min. a 1800 RPMs. El sobrenadante se decantó. El pelete celular se resuspendió en 2 ml de fluido envolvente bovino, y las células se dividieron igualmente en siete tubos apropiadamente marcados. A cada tubo (no el control no marcado, o el control de células muertas original) se añadieron 0,1 mg de partículas cargadas en la superficie, a cada tubo que requiera partículas. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 34°C durante 20 min., o a temperatura ambiente durante 20 min., para determinar si la captación de partículas está facilitada a una mayor temperatura. Después de que el período de incubación hubo expirado, las suspensiones celulares que contienen las partículas y las células marcadas magnéticamente se colocaron en un campo magnético. Una vez que se recogió el pelete magnético, el sobrenadante no magnético se aspiró y se colocó en otro tubo. Se añadió yoduro de propidio a la fracción no magnética, para marcar la población muerta y que está muriendo, para compararla con el porcentaje original de células muertas y que están muriendo que no fueron tratadas con las partículas. Las células se incubaron con 100 μ l de yoduro de propidio en la oscuridad durante 20 min., y se analizaron mediante un citómetro de flujo. El porcentaje de células muertas original fue aproximadamente 81%, y se redujo hasta 15% usando el tratamiento con partículas magnéticas (FIG. 1).

- Eliminación de esperma muerto y que está muriendo desde una muestra de semen de toro reciente. Se recogió un eyaculado de cada uno de tres toros. Se registró la concentración de esperma y el volumen del eyaculado, y se dividieron 640×10^6 células por eyaculado en cuatro alícuotas. Las células se centrifugaron suavemente a 5000 RPMs durante 6 min., y el plasma seminal se aspiró del pelete con una pipeta. Cada pelete celular se resuspendió en 4 ml de medio TRIS precalentado, de manera que la concentración de células fue 160×10^6 células/ml. Se pipeteó un ml de cada pelete celular resuspendido en cuatro tubos cónicos de 50 ml diferentes: 1) control 34°C, 2) control RT, 3) partícula tratada 34°C, y 4) partícula tratada RT. A cada muestra tratada, se añadieron 100 μ l de una disolución madre de 1,8 mg de partículas magnéticas de carga negativa neta resuspendidas en 600 μ l de amortiguador de almacenamiento (pH 7,4 PBS + 0,1% de BSA), y se colocaron a la temperatura apropiada durante 20 min. Después de que terminó el período de incubación de 20 min., para aquellas muestras que contienen partículas, se colocaron enfrente de un imán durante 1 min. La fracción no magnética se aspiró fuera del tubo y se colocó en un tubo eppendorf. De cada muestra después de que se terminó cada separación magnética, las alícuotas

se analizaron mediante citometría de flujo en busca del porcentaje de muertes antes del tratamiento de las partículas, así como el porcentaje de muertes después del tratamiento de las partículas. El incremento promedio en el esperma viable tras el tratamiento de las partículas fue 18,7% (un cambio de un promedio de 74,68% viable a 93,38% viable tras el tratamiento). La separación óptima se puede producir una vez que el esperma que es susceptible ha comenzado el proceso de capacitación y la alteración de la membrana, y ha comenzado a morir. Esto ocurre una vez que el pH del esperma se ha incrementado en al menos 0,36 unidades de pH (Vredenburgh-Wilberg, W.I. y Parrish, J.J. "Intracellular pH of Bovine Sperm Increases During Capacitation", Molecular Reproduction and Development 40:490-502, 1995).

Resultados:

Toro A Control 34°C	77,90%	Toro A Tratado 34°C	94,90%
Toro A Control RT	77,60%	Toro A Tratado RT	95,37%
Toro B Control 34°C	78,73%	Toro B Tratado 34°C	98,70%
Toro B Control RT	83,53%	Toro B Tratado RT	97,87%
Toro C Control 34°C	66,60%	Toro C Tratado 34°C	88,43%
Toro C Control RT	63,87%	Toro C Tratado RT	85,03%

EJEMPLO 3: Eliminación de esperma dañado de eyaculados de semental. Se recogió un eyaculado de cada uno de tres sementales. La concentración de esperma del eyaculado se determinó usando un densímetro. La movilidad se determinó objetivamente mediante un Sperm Vision CASA System (MiniTube, Verona, WI, USA). Se midió el pH del eyaculado bruto. Se retiraron dos alícuotas de 160 x 10⁶ esperma total de cada eyaculado de cada semental, que representan muestras del control y tratadas. Para las muestras del control, el esperma se resuspendió inmediatamente en 1 ml de medio de Whitten modificado (pH 7,0) (Funahashi et al., 1996; Biology of Reproduction, 54:1412-1419), y se mantuvo a temperatura ambiente. Para el esperma tratado con partículas, se añadieron 160 x 10⁶ de esperma total de cada semental a 1 ml de partículas procedentes de una disolución madre de 3,6 mg/ml que se habían recogido y retirado de un medio de almacenamiento de partículas y que se habían suspendido en 1 ml de medio de Whitten modificado, en un tubo Falcon de 50 ml. La mezcla de esperma/partículas se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 min. Tras la incubación, el tubo se colocó sobre un imán durante 3 min. La fracción no magnética se eliminó por aspiración, y se transfirió a un tubo de ensayo limpio. La movilidad total y progresiva del esperma enriquecido procedente de cada semental se determinó usando el Sperm Vision CASA System, y se comparó con las determinaciones de movilidad iniciales.

Todas las muestras se diluyeron entonces hasta 25 x 10⁶ esperma progresivamente móvil/ml con E-Z Mixin® CST (Animal Reproduction Systems, Chino, CA, USA), y se dejaron enfriar hasta 5°C durante 24 h. Tras el período de enfriamiento de 24 h, las muestras se calentaron hasta 37,5°C durante 10 min., y se evaluaron para determinar la movilidad total y progresiva usando el Sperm Vision CASA System.

Resultados:

Semental A				
Eyaculado pH: 6,91				
	0-h	0-h	Enfriado 24 h	Enfriado 24 h
	Movilidad total %	Movilidad progresiva %	Movilidad total %	Movilidad progresiva %
Control	78	59	50	45
Tratado	88	73	60	50

Semental B				
Eyaculado pH: 6,96				
	0-h	0-h	Enfriado 24 h	Enfriado 24 h
	Movilidad total %	Movilidad progresiva %	Movilidad total %	Movilidad progresiva %

Control	61	48	11	6
Tratado	65	51	26	22
Semental C				
Eyaculado pH: 7,40				
	0-h	0-h	Enfriado 24 h	Enfriado 24 h
	Movilidad total %	Movilidad progresiva %	Movilidad total %	Movilidad progresiva %
Control	75	72	53	47
Tratado	88	82	61	58

RESULTADOS GLOBALES					
		0-h	0-h	Enfriado 24 h	Enfriado 24 h
	N	Movilidad total %	Movilidad progresiva %	Movilidad total %	Movilidad progresiva %
Control	3	71,3	59,7	38	32,7
Tratado	3	80,3	68,7	49	43,3

5 La eliminación de espermatozoides dañados/muertos de un eyaculado reciente, seguido de la extensión y enfriamiento de espermatozoides durante 24 h, dio como resultado un incremento en el espermatozoides móvil tanto total como progresivo en cada muestra tratada, en comparación con los controles. La mejora global en las puntuaciones de movilidad de las muestras tratadas se observó tanto en el período de 0 h (antes del enfriamiento) como en el período de 24 h tras el enfriamiento.

10 **EJEMPLO 4: Eliminación de espermatozoides dañados de eyaculados de semental antes de la crioconservación.** En el día 1, se recogió un único eyaculado de cada uno de dos sementales y se dividió en dos alícuotas, uno para el control no tratado y el otro para la muestra tratada con partículas. El semen puro se diluyó inmediatamente 1:1 con medio de Whitten modificado. Las muestras diluidas se centrifugaron durante 7 min. para eliminar el plasma seminal. El sobrenadante se aspiró inmediatamente y se desechó. El pelete de espermatozoides se suspendió, y se obtuvo la concentración de espermatozoides. Las alícuotas del control no tratado se resuspendieron hasta 40×10^6 células/ml en yema de huevo francesa/extendedor de leche que contiene 5% de glicerol. El espermatozoides del control se enfrió durante 2 h a 5°C, se empaquetó en pajuelas de 0,5 ml, y se congeló sobre vapor de nitrógeno líquido. A las alícuotas tratadas, se añadieron 1:1 ml de partículas (3,6 mg/ml) resuspendidas en medio de Whitten modificado hasta 160×10^6 espermatozoides total contenido en 500 µl de medio de Whitten modificado. Las muestras tratadas se dejaron incubar con las partículas durante 20 min. a temperatura ambiente. Tras el tiempo de exposición de las partículas al espermatozoides, las partículas se recogieron magnéticamente, y la fracción no magnética se aspiró y se dispuso en un tubo distinto. Muestras tratadas para ambos sementales se extendieron hasta un total de 4 ml con una yema de huevo francesa/extendedor de leche que contiene 5% de glicerol. El espermatozoides tratado se dejó enfriar durante 2 h a 5°C, y se empaquetó en pajuelas de 0,5 ml y se congeló sobre nitrógeno líquido.

25 En el día 2, se recogió un único eyaculado de cada uno de dos sementales, y cada eyaculado se dividió en dos alícuotas: control no tratado y tratado con partículas. El semen puro se diluyó 1:1 con medio de Whitten modificado, y se centrifugó durante 9 min. El plasma seminal se aspiró y se desechó. Para las muestras tanto de control como tratadas, se depositaron 80×10^6 espermatozoides total en 275 µl de medio de Whitten. Las muestras del control se extendieron hasta 40×10^6 espermatozoides/ml en un total de 2 ml con EZ Freezin-LE (Animal Reproduction Systems) un extendedor de congelación de lactosa/EDTA preempaquetado que contiene 5% de glicerol. Las muestras tratadas se dejaron incubar con las partículas durante 20 min. a temperatura ambiente. Después de que expiró el período de incubación, las células marcadas magnéticamente se recogieron en un imán, y las células no magnéticas se aspiraron y se colocaron en otro tubo. Las muestras tratadas se resuspendieron hasta 40×10^6 espermatozoides/ml en un total de 2 ml con EZ Freezin-LE. El semen extendido procedente de cada semental/tratamiento se empaquetó en pajuelas de 0,5 ml, y se colocó en un estante de congelación. El estante de congelación se colocó dentro de una caja de styrofoam que contiene una profundidad conocida de nitrógeno líquido, de manera que las pajuelas estuvieron en la fase de vapor del nitrógeno, y la tapa se colocó de forma suelta sobre la parte superior de la caja.

Resultados:

Semental	CONTROL (%)				TRATADO (%)			
	Movilidad total	Movilidad progresiva	Vivo	Muerto	Movilidad total	Movilidad progresiva	Vivo	Muerto
Sammy	5	2	22	78	45	30	70	30
Gunsmoke	15	5	14	86	40	10	75	25
Tinman	62	22	56	44	67	26	73	27
Scotti	62	34	50	50	58	33	54	46

MOVILIDAD TOTAL Y PROGRESIVA MEDIAS 0 h (%) y Vivo/Muerto (%)				
	Movilidad total	Movilidad progresiva	Vivo	Muerto
Control	36	16	36	64
Tratado	52	25	68	32

N = 4 sementales

5 La eliminación de esperma de semental dañado/muerto antes de la crioconservación aumentó la movilidad total y progresiva tras la descongelación a 0 h en 44% y 62% respectivamente, en comparación con el esperma de control. El porcentaje de esperma viable inmediatamente después de la descongelación se incrementó 32 puntos porcentuales u 89% cuando el esperma muerto y/o dañado se eliminó antes de la crioconservación. La eliminación de esperma comprometido antes de la crioconservación incrementó la calidad global del esperma.

10 Las medidas del potencial zeta de las perlas magnéticas revestidas con silano que contiene grupos carboxilo en amortiguadores tales como TRIS, TALP, dH₂O, y amortiguador de almacenamiento, se midieron mediante un medidor del potencial zeta, y en las FIGs. 2-7 se muestra el potencial zeta neto resultante. Las partículas con un revestimiento de carboxilsilano en este ejemplo se miden como un potencial zeta negativo neto en cada condición de amortiguador, y se puede esperar que se unan a esperma que ha sufrido o que está sufriendo capacitación y que está perdiendo la carga negativa neta observada en el esperma viable.

15 Hasta el grado en que el término “incluye” o “incluyendo” se usa en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones, se pretende que sea inclusivo de una manera similar al término “que comprende”, puesto que ese término se interpreta cuando se emplea como una palabra de transición en una reivindicación. Además, hasta el grado en el que el término “o” se emplea (por ejemplo, A o B), se quiere decir que “A o B o ambos”. Cuando los solicitantes pretenden indicar “solamente A o B, pero no ambos”, entonces se empleará la expresión “solamente A o B, pero no ambos”. De este modo, el uso del término “o” aquí es el uso inclusivo, y no el exclusivo. Véase Bryan A. Garner, A Dictionary of Modern Legal Usage 624 (2d. Ed. 1995). También, hasta el grado en el que los términos “en” o “dentro” se usan en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones, se pretende que signifiquen adicionalmente “sobre” o “encima”. Hasta el grado en el que el término “selectivamente” se usa en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones, se pretende referir a una condición de un componente en la que un usuario de un aparato puede activar o desactivar la característica o función del componente según sea necesario o deseado en el uso del aparato. Hasta el grado en el que los términos “acoplado” o “conectado operativamente” se usan en la memoria descriptiva o las reivindicaciones, se quiere decir que los componentes identificados están conectados de una manera para llevar a cabo una función designada. Hasta el grado en el que el término “sustancialmente” se usa en la memoria descriptiva o las reivindicaciones, se quiere decir que los componentes identificados tienen la relación o cualidades indicadas con el grado de error que sería aceptable en la industria del objeto.

30 Como se usa en la memoria descriptiva o las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una”, y “el”, incluyen el plural, excepto que se especifique expresamente el singular. Por ejemplo, la referencia a “un compuesto” puede incluir una mezcla de dos o más compuestos, así como un único compuesto.

Como se usa aquí, el término “alrededor de”, junto con un número, pretende incluir ±10% del número. En otras palabras, “alrededor de 10” puede significar de 9 a 11.

35 Como se usa aquí, los términos “opcional” y “opcionalmente” significan que la circunstancia descrita subsiguientemente puede ocurrir o no, de manera que la descripción incluye casos en los que ocurre la circunstancia y casos en los que no.

40 Además, cuando se describen características o aspectos de la descripción en términos de los grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la descripción también se describe de ese modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush. Como entenderá un experto en la

técnica, para todos y cada uno de los fines, tal como en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos descritos aquí también engloban todos y cada uno de los subintervalos posibles y combinaciones de sus subintervalos. Cualquier intervalo dado se puede reconocer fácilmente como que describe suficientemente y permite que el mismo intervalo se pueda romper en al menos mitades iguales, tercios, cuartos, quintos, décimos, y similares.

5 Como ejemplo no limitante, cada intervalo discutido aquí se puede romper fácilmente en un tercio inferior, tercio central y tercio superior, y similar. Como también entenderá un experto en la técnica, todo lenguaje tal como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que", incluye el número citado, y se refiere a los intervalos que se pueden romper subsiguientemente en subintervalos como se discute anteriormente. Finalmente, como entenderá un experto en la técnica, un intervalo incluye cada miembro individual. Por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, o 3 células. De forma similar, un grupo que tiene 1-5 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4, o 5 células, etc. Aunque se han descrito aquí diversos aspectos y realizaciones, otros aspectos y realizaciones serán manifiestos para los expertos en la técnica.

15 Como se señala anteriormente, aunque la presente solicitud se ha ilustrado mediante la descripción de sus realizaciones, y aunque las realizaciones se han descrito con considerable detalle, no es intención de los solicitantes restringir o de ningún modo limitar el alcance de las reivindicaciones anejas a tal detalle. Ventajas y modificaciones adicionales aparecerán fácilmente para aquellos expertos en la técnica, que tienen el beneficio de la presente solicitud. Por lo tanto, la solicitud, en sus aspectos más amplios, no está limitada a los detalles específicos, a ejemplos ilustrativos mostrados, o a cualquier aparato citado.

20 Los diversos aspectos y realizaciones descritos aquí son para fines ilustrativos, y no están destinados a ser limitantes, estando indicado el verdadero alcance por las siguientes reivindicaciones.

En los siguientes párrafos se pueden encontrar algunos aspectos adicionales de la descripción:

1. Una composición para la manipulación celular magnética, comprendiendo la composición una pluralidad de partículas, comprendiendo cada partícula en la pluralidad de partículas:

25 un sustrato magnético, el sustrato magnético caracterizado por una susceptibilidad magnética mayor que cero; y

un compuesto que contiene silicio cargable, revistiendo el compuesto que contiene silicio cargable al menos una porción del sustrato magnético.

2. La composición del párrafo 1, comprendiendo el sustrato magnético un óxido metálico.

3. La composición del párrafo 1, comprendiendo el sustrato magnético Fe₃O₄.

30 4. La composición del párrafo 1, caracterizado el sustrato magnético por uno o más de paramagnetismo, superparamagnetismo, ferromagnetismo, o ferrimagnetismo.

5. La composición del párrafo 1, comprendiendo el compuesto que contiene silicio cargable 2-(carbometoxi)etiltrimetoxisilano.

6. La composición del párrafo 1, que comprende una carga de potencial zeta negativa.

35 7. La composición del párrafo 1, comprendiendo al menos una porción de la pluralidad de partículas una primera carga de potencial zeta, formando la porción de la pluralidad de partículas un complejo con una o más células o estructuras celulares que comprenden una segunda carga de potencial zeta, siendo la segunda carga zeta opuesta en signo en comparación con la primera carga de potencial zeta.

40 8. La composición del párrafo 1, comprendiendo al menos una porción de la pluralidad de partículas una carga de potencial zeta negativa, formando la porción de la pluralidad de partículas un complejo con una o más células de esperma o estructuras celulares de esperma que comprenden una carga de potencial zeta positiva.

9. La composición del párrafo 1, comprendiendo además al menos una porción de la pluralidad de partículas al menos uno de una proteína, un anticuerpo, y un tinte.

10. Un método para la manipulación celular magnética, comprendiendo el método:

45 poner en contacto una composición con una muestra biológica para formar una mezcla,

comprendiendo la composición una pluralidad de partículas que comprenden:

un sustrato magnético, caracterizado el sustrato magnético por una susceptibilidad magnética mayor que cero; y

50 un compuesto que contiene silicio cargable, revistiendo el compuesto que contiene silicio cargable al menos una porción del sustrato magnético;

y

comprendiendo la muestra biológica células y/o estructuras celulares; y

aplicar un campo magnético a la mezcla para manipular la composición.

5 11. El método del párrafo 10, que comprende además hacer que el compuesto que contiene silicio cargable adquiera una primera carga de potencial zeta, siendo la primera carga de potencial zeta opuesta en signo en comparación con una segunda carga de potencial zeta comprendida por las células y/o estructuras celulares en la muestra biológica.

10 12. El método del párrafo 10, que comprende además causar que la composición y al menos una porción de las células y/o estructuras celulares en la muestra biológica formen un complejo, con lo cual, la aplicación del campo magnético a la mezcla para manipular la composición manipula el complejo.

13. El método del párrafo 10, comprendiendo además al menos una porción de la pluralidad de partículas al menos uno de una proteína, un anticuerpo, y un tinte.

14. El método del párrafo 10,

15 comprendiendo la muestra biológica: células viables y células o estructuras celulares dañadas o comprometidas, formando la composición un complejo con una de las células viables o las células o estructuras celulares dañadas o comprometidas, y

comprendiendo además el método separar las células viables de las células o estructuras celulares dañadas o comprometidas, aplicando el campo magnético a la mezcla.

15. El método del párrafo 10,

20 comprendiendo la muestra biológica células de esperma viables y células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas, formando la composición un complejo con las células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas, y

comprendiendo además el método separar las células de esperma viables del complejo que incluye las células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas, aplicando el campo magnético a la mezcla.

25 16. El método del párrafo 15, que comprende además someter la muestra biológica a detección de células de esperma.

17. El método del párrafo 16, en el que la detección comprende detección por fluorescencia.

18. Un kit para la manipulación celular magnética, comprendiendo el kit:

instrucciones, comprendiendo las instrucciones:

30 poner en contacto una composición con una muestra biológica para formar una mezcla;

aplicar un campo magnético a la mezcla para manipular la composición;

la composición, comprendiendo la composición una pluralidad de partículas, comprendiendo cada partícula en la pluralidad de partículas:

35 un sustrato magnético, caracterizado el sustrato magnético por una susceptibilidad magnética mayor que cero; y

un compuesto que contiene silicio cargable, revistiendo el compuesto que contiene silicio cargable al menos una porción del sustrato magnético.

19. El kit del párrafo 18,

40 en el que la muestra biológica comprende células viables y células o estructuras celulares dañadas o comprometidas, formando la composición un complejo con una de las células viables o las células o estructuras celulares dañadas o comprometidas, y

comprendiendo además las instrucciones separar las células viables de las células o estructuras celulares dañadas o comprometidas, aplicando el campo magnético a la mezcla.

45 20. El kit del párrafo 18, configurándose la composición para formar un complejo con células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas, comprendiendo además las instrucciones:

seleccionar la muestra biológica que comprende células de esperma viables y células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas; y

separar las células de esperma viables del complejo que incluye las células de esperma o estructuras celulares de esperma dañadas o comprometidas, aplicando el campo magnético a la mezcla.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la manipulación celular magnética, comprendiendo el método:
- poner en contacto una composición con una muestra biológica para formar una mezcla,
- 5 comprendiendo la composición una pluralidad de partículas, comprendiendo cada partícula en la pluralidad de partículas:
- un sustrato magnético, el sustrato magnético caracterizado por una susceptibilidad magnética mayor que cero;
- 10 un compuesto que contiene silicio cargable, revistiendo el compuesto que contiene silicio cargable al menos una porción del sustrato magnético; y
- comprendiendo la muestra biológica células de esperma viables y células de esperma dañadas o comprometidas, formando las partículas complejos con las células de esperma dañadas o comprometidas mediante una interacción de carga eléctrica ; y
- aplicar un campo magnético a la mezcla para manipular la composición ; y
- 15 separar las células de esperma viables de los complejos.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además hacer que el compuesto que contiene silicio cargable adquiera una primera carga de potencial zeta, siendo la primera carga de potencial zeta opuesta en signo en comparación a una segunda carga de potencial zeta comprendida por las células de esperma dañadas o comprometidas en la muestra biológica.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, que comprende además someter la muestra biológica a detección de células espermáticas.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la detección comprende la detección por fluorescencia.

Células no marcadas con fines de acotamiento

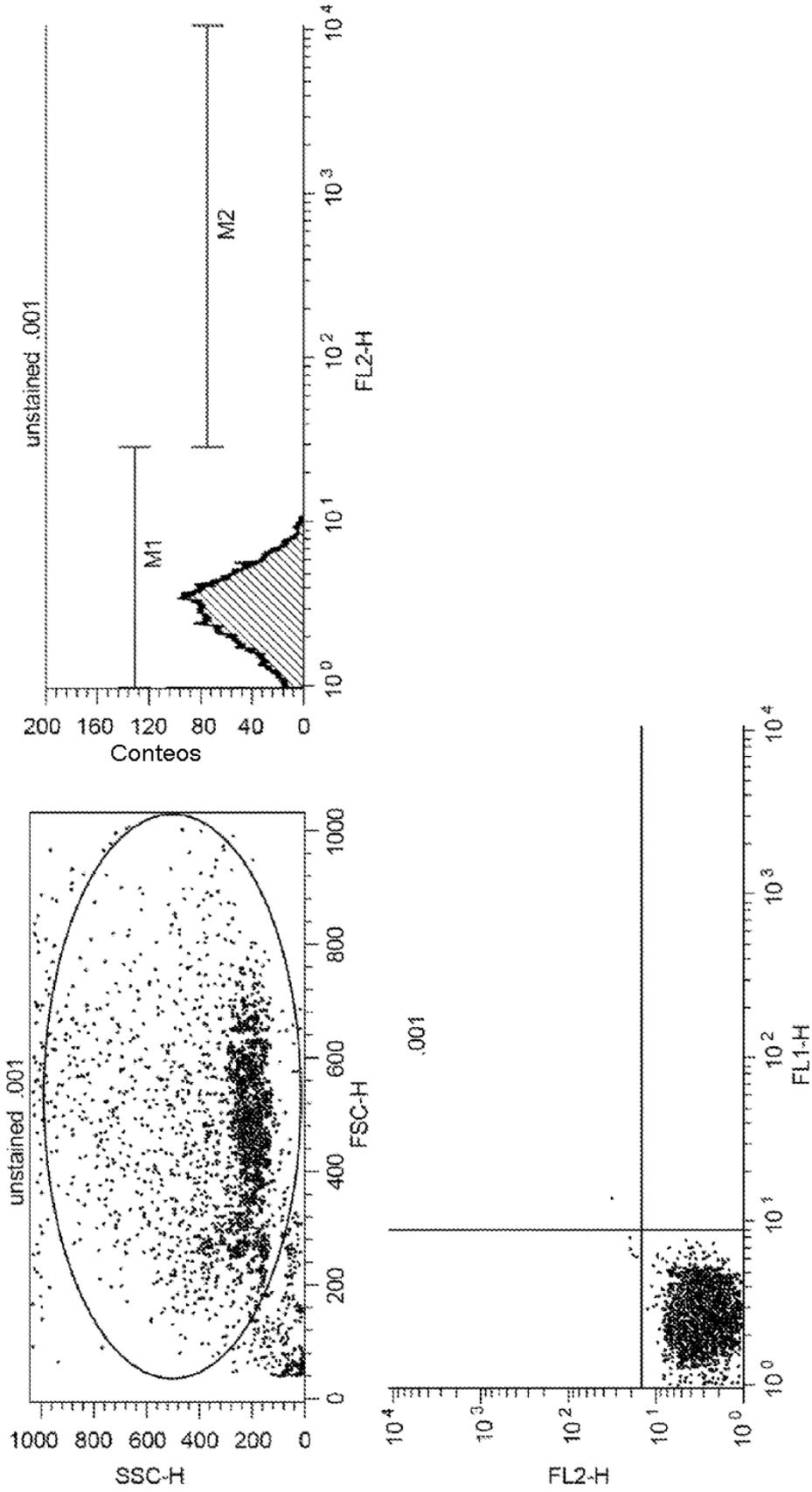


FIG. 1A

Células no tratadas marcadas con yoduro de propidio

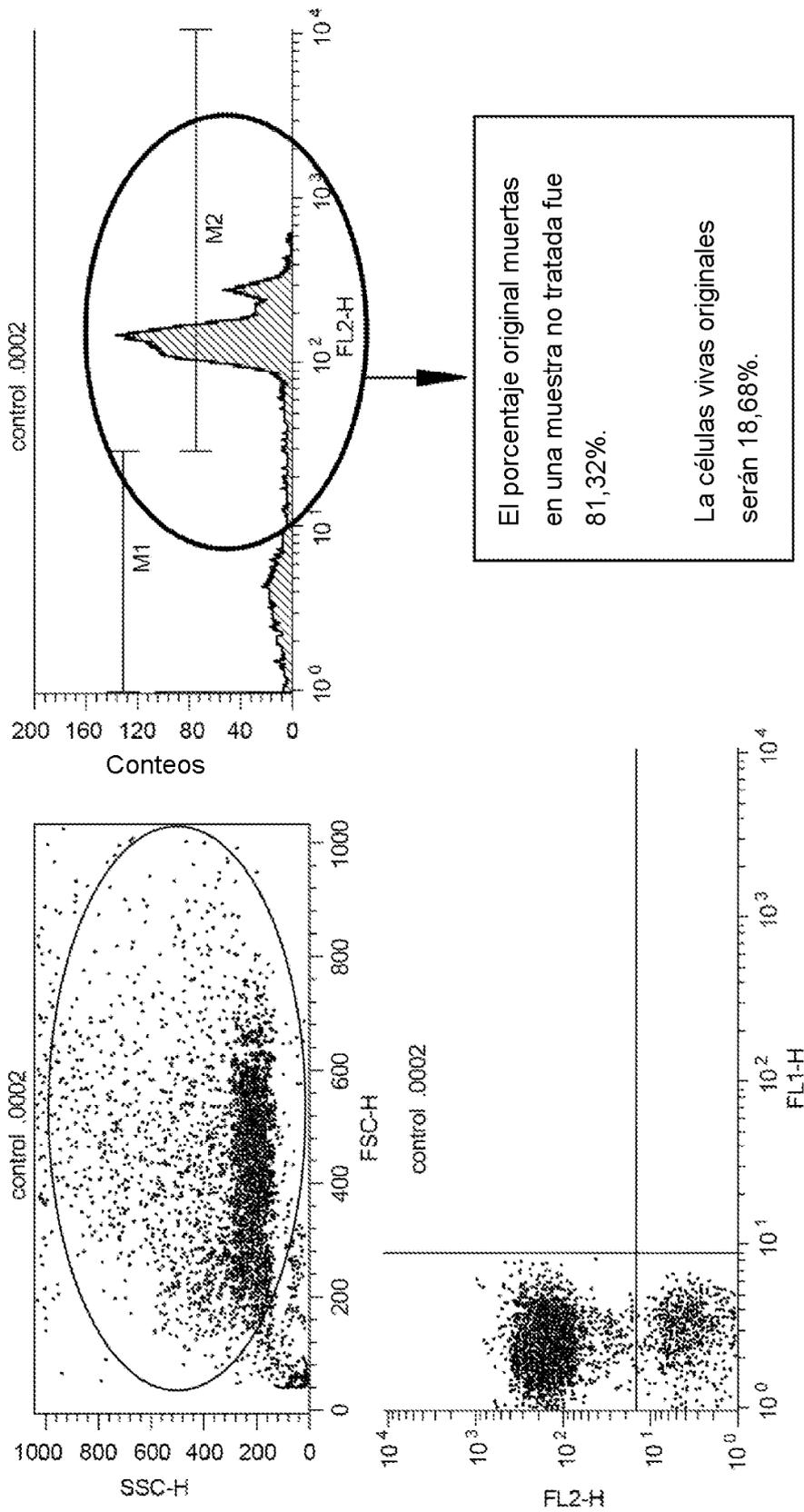


FIG. 1B

Muestras tratadas con partículas a 34C

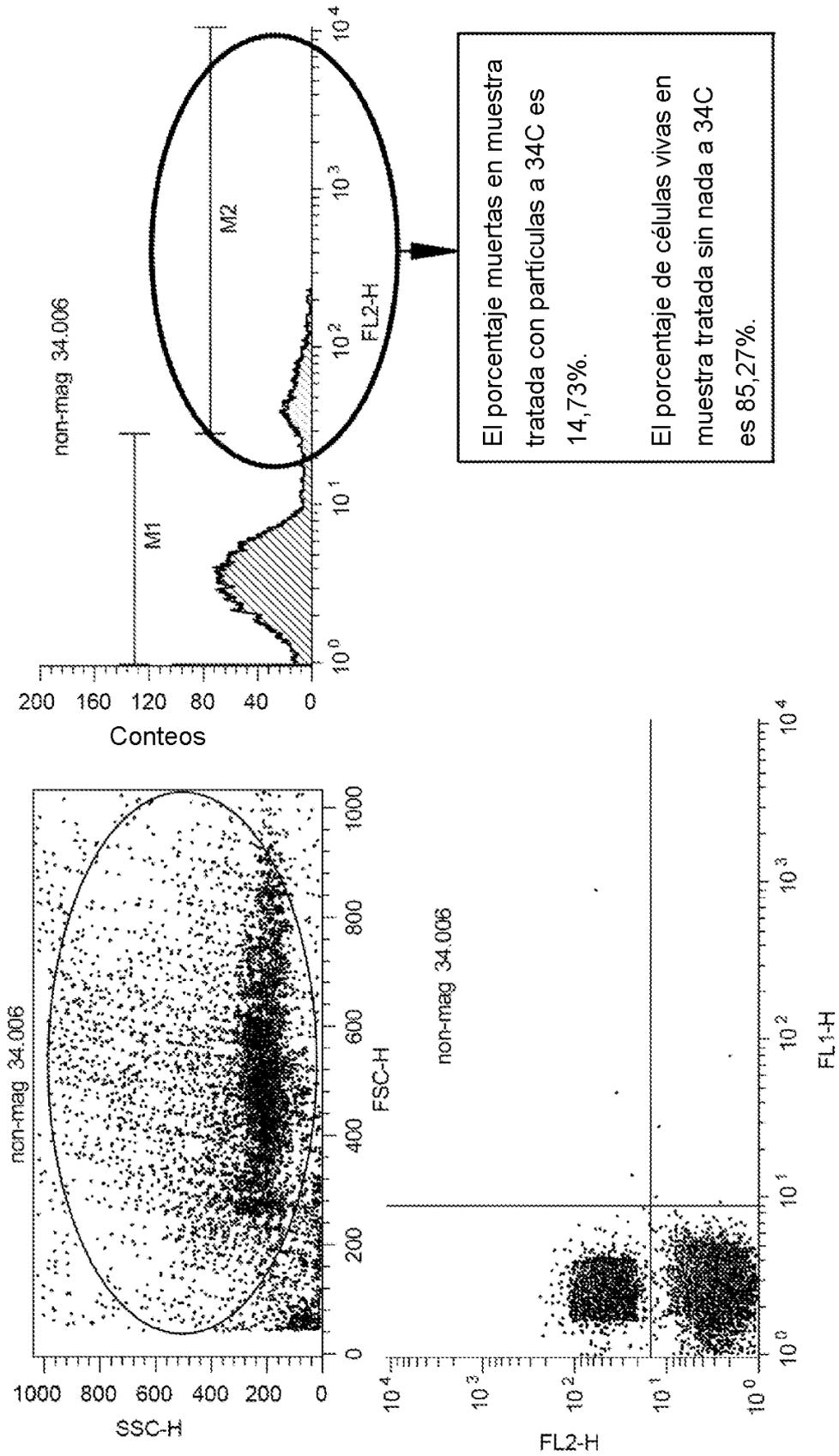


FIG. 1C

Muestras tratadas con partículas a 25C

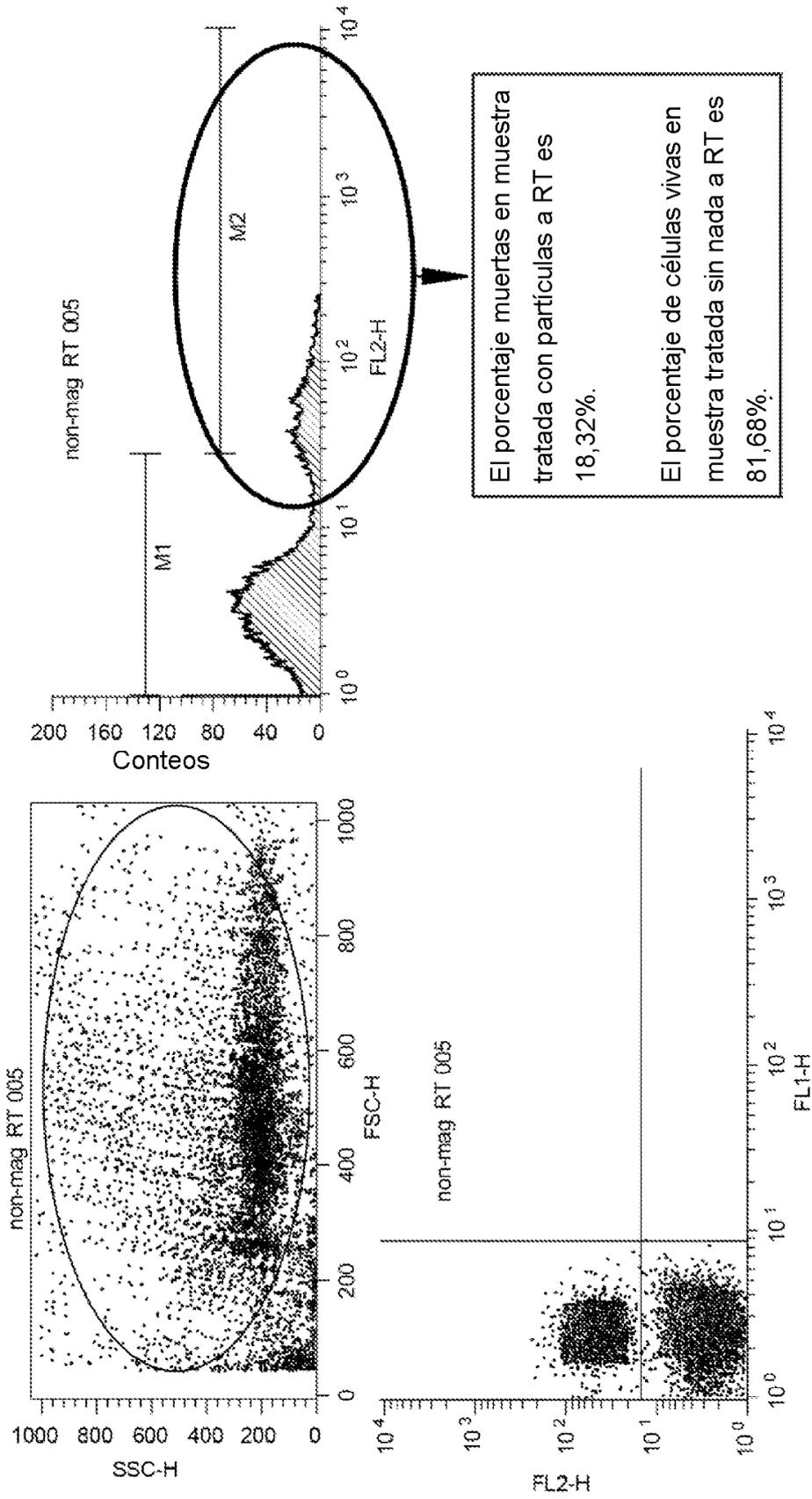


FIG. 1D

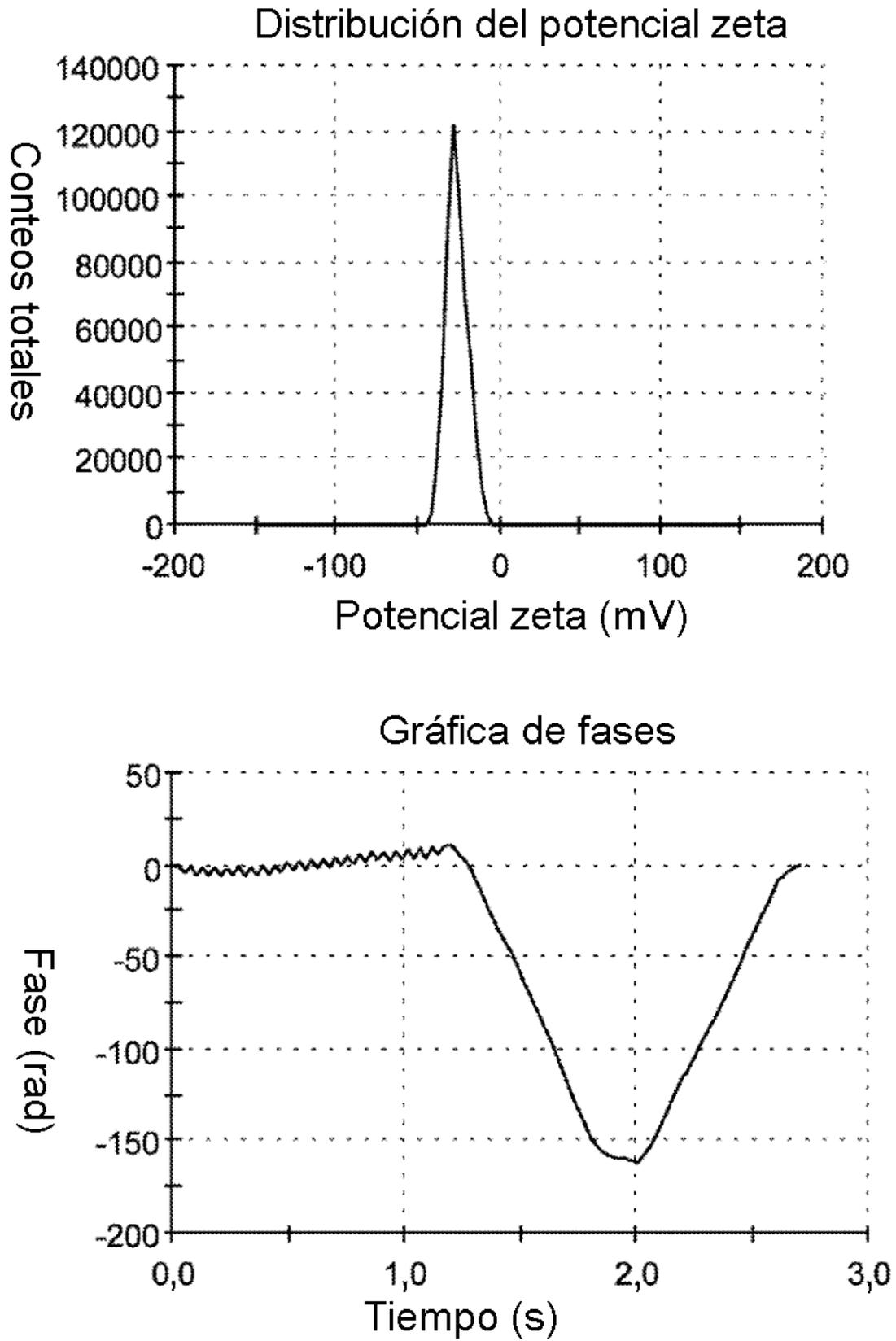


FIG. 2

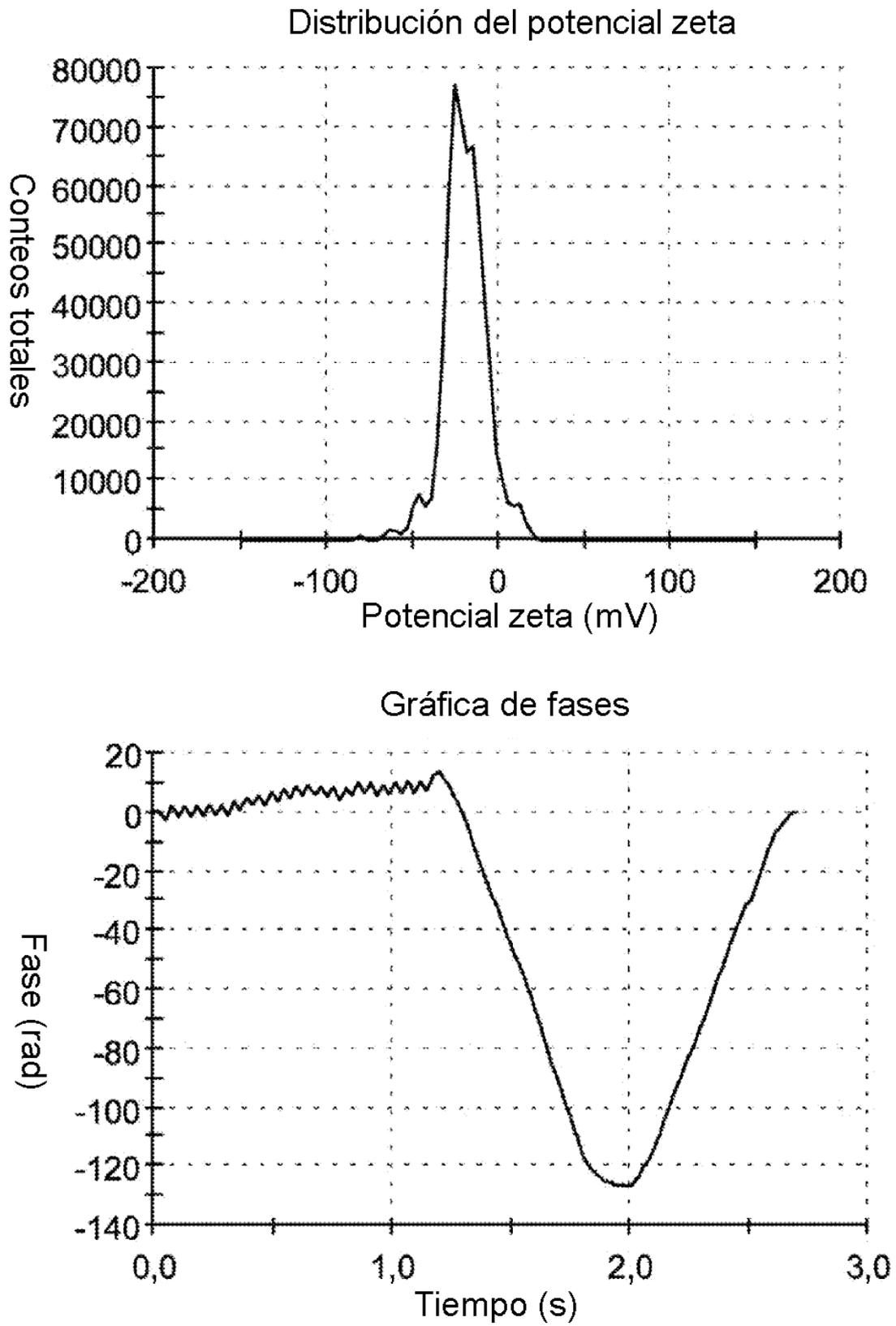


FIG. 3

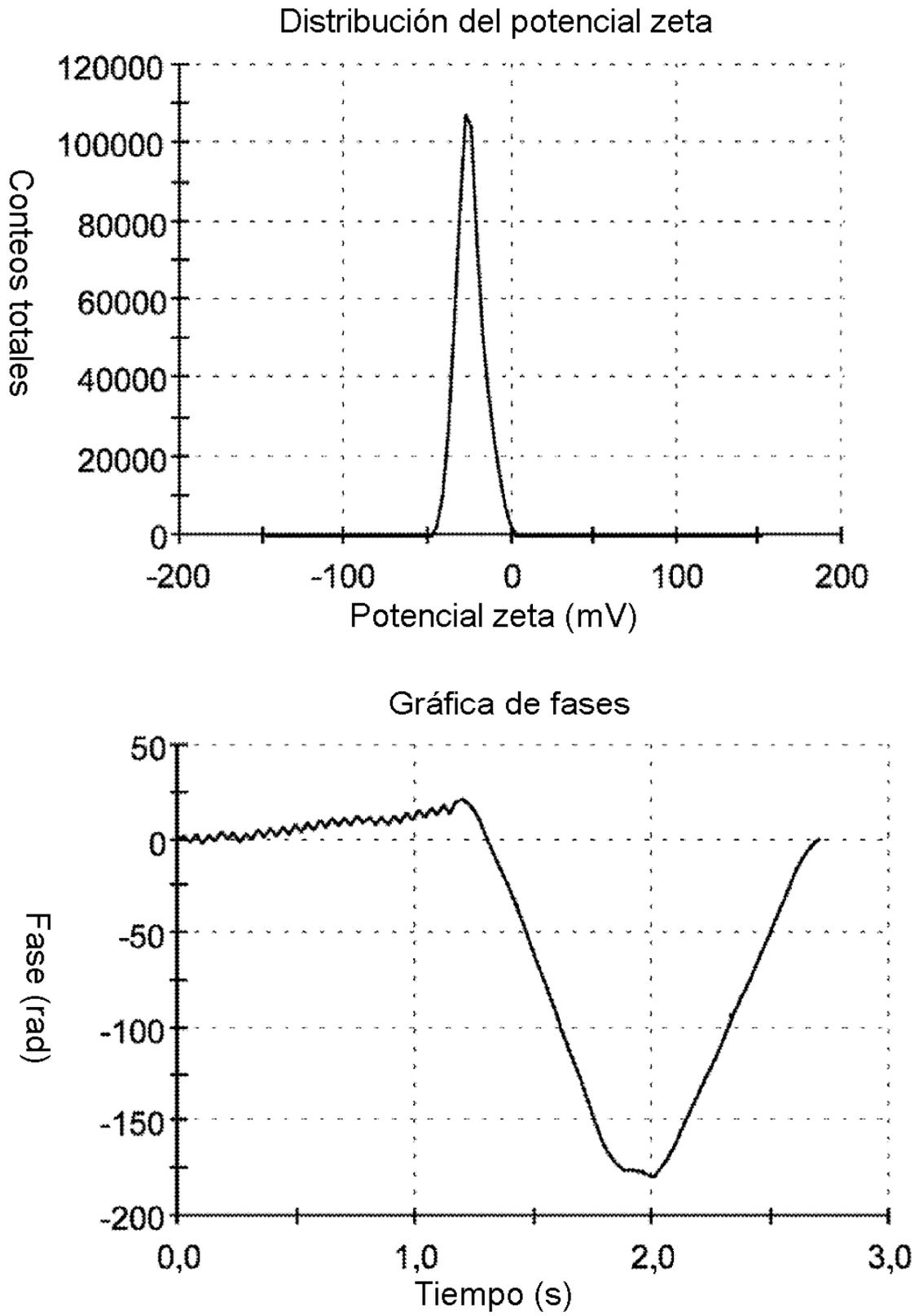


FIG. 4

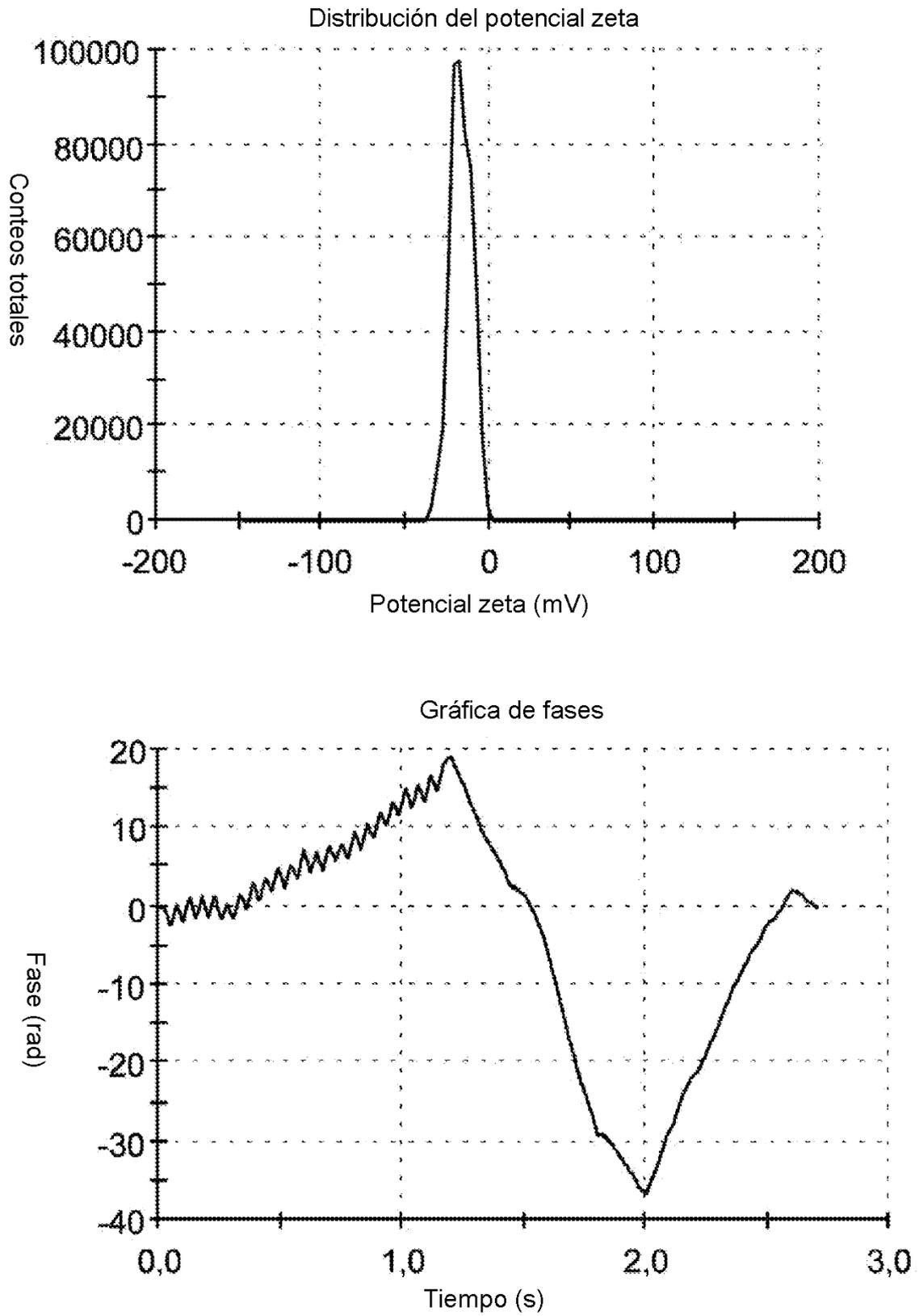


FIG. 5

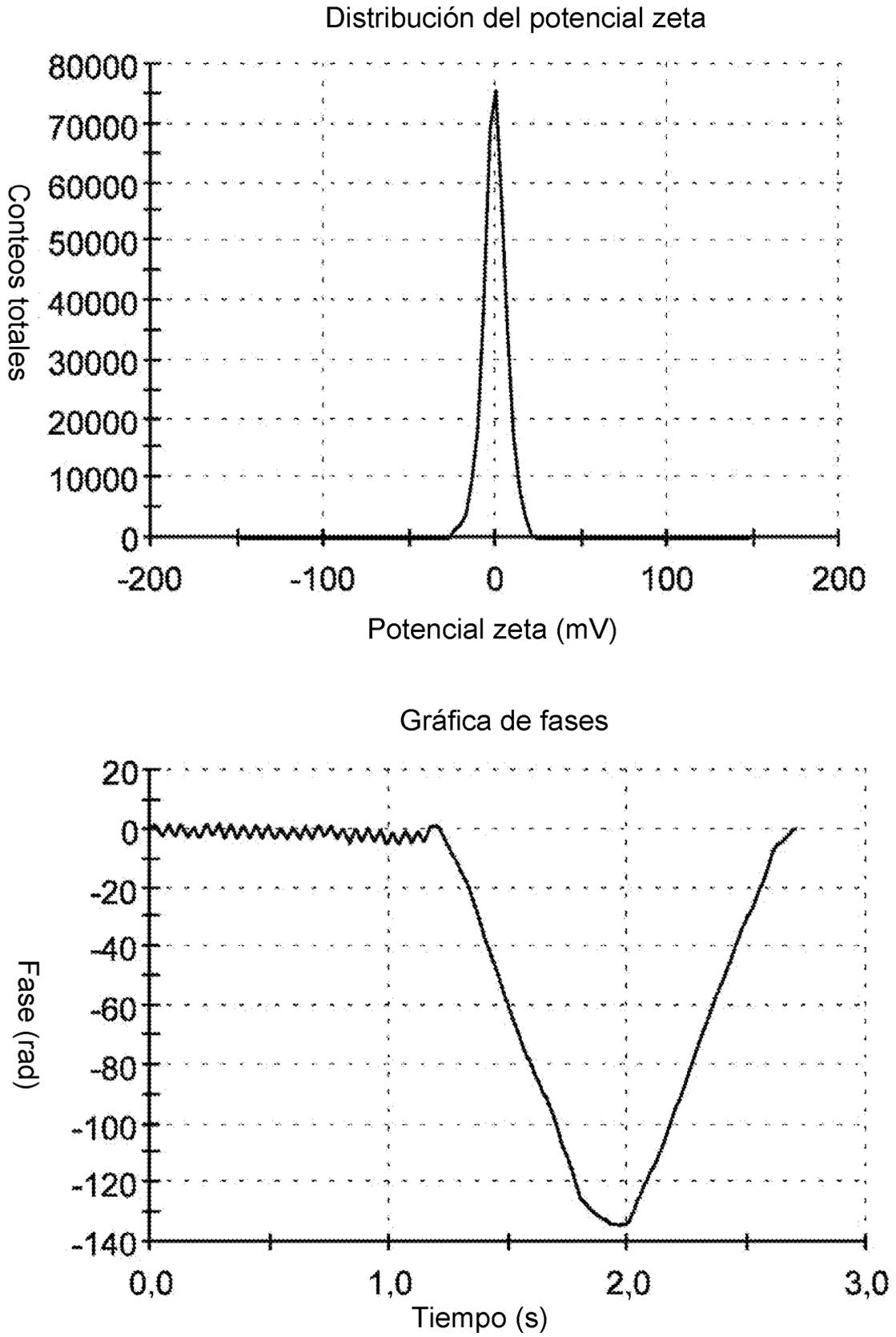


FIG. 6

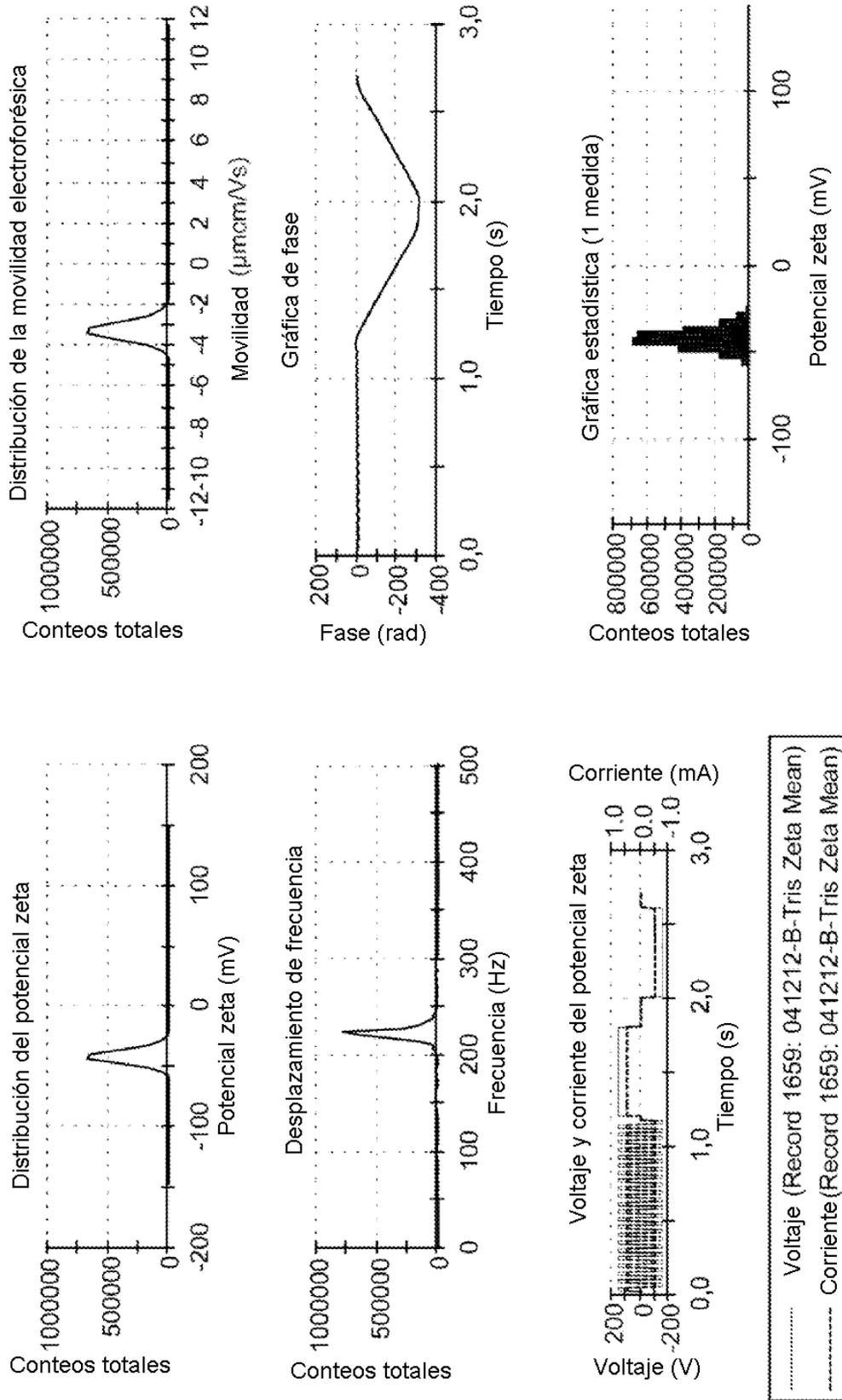


FIG. 7

Parámetros para FIG. 1A:

Estadística del cuadrante			
Archivo:	unstained. 001	Unidades de Log Datos:	Valores lineales
ID de la muestra:	Sin teñir	ID del paciente:	
Tubo:	Sin título	Panel:	Lista de tubo de adquisición sin título
Fecha de adquisición:	09-Dec-11	Acotamiento:	G1
Sucesos acotados:	10000	Sucesos totales:	12962
Parámetro X:	FL1-H (Log)	Parámetro Y:	FL2-H (Log)
Localización del cuad:	9, 14		

Cuad	Sucesos	% Acotado	% Total	Media de X	Media Geo de X	Media de Y	Media Geo de Y
UL	3	0,03	0,02	7,17	7,13	17,80	17,78
UR	1	0,01	13,95	13,95	29,96	29,96	
LL	9996	99,96	77,18	2,76	2,59	3,22	2,88
LR	0	0,00	0,00	***	***	***	***

Parámetros para FIG. 1B:

Estadística del cuadrante			
Archivo:	control.002	Unidades de Log Datos:	Valores lineales
ID de la muestra:	control	ID del paciente:	
Tubo:	Sin título	Panel:	Lista de tubo de adquisición sin título
Fecha de adquisición:	09-Dec-11	Acotamiento:	G1
Sucesos acotados:	10000	Sucesos totales:	11667
Parámetro X:	FL1-H (Log)	Parámetro Y:	FL2-H (Log)
Localización del cuad:	9, 14		

Cuad	Sucesos	% Acotado	% Total	Media de X	Media Geo de X	Media de Y	Media Geo de Y
UL	8132	81,32	69,70	2,73	2,59	143,93	131,70
UR	4	0,04	0,05	15,06	13,04	128,51	120,79
LL	1863	16,63	15,97	3,02	2,83	3,57	3,35
LR	1	0,01	0,01	9,82	9,82	9,22	9,22

ES 2 757 884 T3

Parámetros para FIG. 1C:

Estadística del cuadrante			
Archivo:	non-mag 34,006	Unidades de Log Datos:	Valores lineales
ID de la muestra:	non-mag 34	ID del paciente:	
Tubo:	Sin título	Panel:	Lista de tubo de adquisición sin título
Fecha de adquisición:	09-Dec-11	Acotamiento:	G1
Sucesos acotados:	10000	Sucesos totales:	31123
Parámetro X:	FL1-H (Log)	Parámetro Y:	FL2-H (Log)
Localización del cuad:	9, 14		

Cuad	Sucesos	% Acotado	% Total	Media de X	Media Geo de X	Media de Y	Media Geo de Y
UL	1473	14,73	4,70	2,98	2,74	49,18	43,42
UR	3	0,03	0,01	319,23	82,54	34,20	29,60
LL	8516	85,16	27,36	2,93	2,64	3,87	3,38
LR	8	0,06	0,03	21,04	14,19	7,42	6,31

Parámetros para FIG. 1D:

Estadística del cuadrante			
Archivo:	non-mag RT,005	Unidades de Log Datos:	Valores lineales
ID de la muestra:	non-mag RT	ID del paciente:	
Tubo:	Sin título	Panel:	Lista de tubo de adquisición sin título
Fecha de adquisición:	09-Dec-11	Acotamiento:	G1
Sucesos acotados:	10000	Sucesos totales:	29252
Parámetro X:	FL1-H (Log)	Parámetro Y:	FL2-H (Log)
Localización del cuad:	9, 14		

Cuad	Sucesos	% Acotado	% Total	Media de X	Media Geo de X	Media de Y	Media Geo de Y
UL	1832	18,32	6,26	2,65	2,52	52,41	45,04
UR	0	0,00	0,00	***	***	***	***
LL	8168	81,68	27,92	2,70	2,42	3,63	3,12
LR	0	0,00	0,00	***	***	***	***

Parámetros para FIG. 2

Detalles de la medida			
Nombre de la muestra:	lot-103011 1:10 Zeta 3	Temperatura (°C):	29,0
Nombre del dispersante:	Agua	Velocidad de conteo (kcps):	163,5
Viscosidad (cP):	0,8096	Experimentos de zeta:	12
Dispersante RI:	1,330	Atenuador:	6

ES 2 757 884 T3

Resultados del análisis monomodal			
Calidad del resultado:	Buena	Movilidad ($\mu\text{mcm/Vs}$):	-2,383
Potencial zeta (mV):	-28,2	Desviación estándar ($\mu\text{mcm/Vs}$):	1,876
Desviación estándar (mV):	22,2	Conductividad (mS/cm):	2,48
Factor de calidad:	3,15		

Distribución multimodal			
	Media (mV)	Área (%)	Anchura (mV)
Pico 1:	-26,1	100,0	6,52
Pico 2:	0,00	0,0	0,00
Pico 3:	0,00	0,0	0,00

Parámetros para FIG. 3:

Detalles de la medida			
Nombre de la muestra:	lot-81511 1:10 Zeta 4	Temperatura (°C):	29,0
Nombre del dispersante:	Agua	Velocidad de conteo (kcps):	164
Viscosidad (cP):	0,8096	Experimentos de zeta:	12
Dispersante RI:	1,330	Atenuador:	8

Resultados del análisis monomodal			
Calidad del resultado:	—	Movilidad ($\mu\text{mcm/As}$):	-1,891
Potencial zeta (mV):	-22,4	Desviación estándar ($\mu\text{mcm/Vs}$):	2,354
Desviación estándar (mV):	27,9	Conductividad (mS/cm):	2,54
Factor de calidad:	1,45		

Distribución multimodal			
	Media (mV)	Área (%)	Anchura (mV)
Pico 1:	-25,8	49,6	5,73
Pico 2:	-11,1	43,5	6,77
Pico 3:	-47,3	3,4	3,83

Parámetros para FIG. 4:

Detalles de la medida			
Nombre de la muestra:	lot-043012-A TALP buffer 1:10 Z...	Temperatura (°C):	29,0
Nombre del dispersante:	Agua	Velocidad de conteo (kcps):	183,1
Viscosidad (cP):	0,8096	Experimentos de zeta:	12
Dispersante RI:	1,330	Atenuador:	7

ES 2 757 884 T3

Resultados del análisis monomodal			
Calidad del resultado:	Buena	Movilidad ($\mu\text{mcm/Vs}$):	-2,074
Potencial zeta (mV):	-24,6	Desviación estándar ($\mu\text{mcm/Vs}$):	0,6904
Desviación estándar (mV):	8,18	Conductividad (mS/cm):	1,80
Factor de calidad:	3,54		

Distribución multimodal			
	Media (mV)	Área (%)	Anchura (mV)
Pico 1:	-24,6	100	8,18
Pico 2:	0,00	0,0	0,00
Pico 3:	0,00	0,0	0,00

Parámetros para FIG. 5:

Detalles de la medida			
Nombre de la muestra:	lot-043012-A MRS buffer 1:10 Z...	Temperatura (°C):	29,0
Nombre del dispersante:	Agua	Velocidad de conteo (kcps):	146,5
Viscosidad (cP):	0,8096	Experimentos de zeta:	12
Dispersante RI:	1,330	Atenuador:	6

Resultados del análisis monomodal			
Calidad del resultado:	Buena	Movilidad ($\mu\text{mcm/As}$):	-1,392
Potencial zeta (mV):	-16,5	Desviación estándar ($\mu\text{mcm/Vs}$):	0,5526
Desviación estándar (mV):	6,55	Conductividad (mS/cm):	2,28
Factor de calidad:	3,74		

Distribución multimodal			
	Media (mV)	Área (%)	Anchura (mV)
Pico 1:	-16,5	100	6,55
Pico 2:	0,00	0,0	0,00
Pico 3:	0,00	0,0	0,00

Parámetros para FIG. 6:

Detalles de la medida			
Nombre de la muestra:	lot-043012-A dH2O 1:10 Zeta 2	Temperatura (°C):	29,0
Nombre del dispersante:	Agua	Velocidad de conteo (kcps):	70,4
Viscosidad (cP):	0,8096	Experimentos de zeta:	12
Dispersante RI:	1,330	Atenuador:	6

ES 2 757 884 T3

Resultados del análisis monomodal			
Calidad del resultado:	Buena	Movilidad ($\mu\text{mcm/Vs}$):	-2,244
Potencial zeta (mV):	-26,6	Desviación estándar ($\mu\text{mcm/Vs}$):	6,039
Desviación estándar (mV):	71,6	Conductividad (mS/cm):	0,0331
Factor de calidad:	2,31		

Distribución multimodal			
	Media (mV)	Área (%)	Anchura (mV)
Pico 1:	-0,594	100	6,89
Pico 2:	0,00	0,0	0,00
Pico 3:	0,00	0,0	0,00

Parámetros para FIG. 7:

Detalles de la muestra			
Nombre de la muestra:	041212-B-Tris Zeta Mean		
Nombre SOP:	Zeta estándar 3 x 20 25C no esperar.sop		
Nombre del archivo:	2012-01020 nueva medida...	Nombre del dispersante:	Agua
Número de registro:	1659	Dispersante RI:	1,330
Fecha y hora de medida:	Viernes, 20 de abril, 2012 2:55:0...	Viscosidad (cP):	0,8872

Sistema			
Temperatura (°C):	25,0	Experimentos de zeta:	20
Velocidad de conteo (kcps):	2456,7	Posición de medida (mm):	2,00
Descripción de la celda:	Celda zeta desechable transparente	Atenuador:	9

Resultados	
Calidad del resultado:	Buena
Potencial zeta (mV):	-42,2
SD zeta (mV):	5,70
Movilidad ($\mu\text{mcm/Vs}$):	-3,307
SD de la movilidad ($\mu\text{mcm/Vs}$):	0,4464
Potencial zeta de la pared (mV):	-47,9
Voltaje eficaz (V):	151
Conductividad (mS/cm):	0,240

	Media (mV)	Área (%)	Anchura (mV)
Pico 1:	-42,2	100	5,64
Pico 2:	0,00	0,0	0,00
Pico 3:	0,00	0,0	0,00