

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 608**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2010 E 10715593 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2403933**

54 Título: **Dispositivo para diagnosticar el estado fisiológico y/o seleccionar los mejores espermatozoides de una muestra de semen en base a quimiotaxis y procedimiento de uso del mismo**

30 Prioridad:

03.03.2009 AR P090100749

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

22.07.2015

73 Titular/es:

**CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET) (50.0%)
Av. Rivadavia 1906 3 "F"
Buenos Aires C1033 AAJ, AR y
INIS BIOTECH LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GIOJALAS, LAURA CECILIA;
GUIDOBALDI, HÉCTOR ALEJANDRO;
GATICA, LAURA VIRGINIA;
TEVES, MARÍA EUGENIA;
MONTESINOS, MARÍA DEL MAR y
UÑATES, DIEGO RAFAEL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 541 608 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para diagnosticar el estado fisiológico y/o seleccionar los mejores espermatozoides de una muestra de semen en base a quimiotaxis y procedimiento de uso del mismo

5

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo para diagnosticar el estado fisiológico y/o seleccionar los mejores espermatozoides de una muestra de semen en base a quimiotaxis, y al procedimiento de uso del mismo, permitiendo mediante un dispositivo simple y económico, diagnosticar y seleccionar los mejores espermatozoides en un solo paso. Solo será necesario contar con el presente dispositivo, un microscopio óptico común, y personal con conocimiento elemental de manejo de laboratorio.

10

Estado de la técnica

15

La quimiotaxis del espermatozoide es un mecanismo de transporte celular que guía a los espermatozoides hacia un gradiente de concentración de un attractante. En los últimos años se han realizado esfuerzos para poder diferenciar la quimiotaxis de un proceso de acumulación de células mediado por otros mecanismos.

20

El proceso de quimiotaxis ha sido observado en diferentes especies de mamíferos, por ejemplo humanos, ratones, conejos y otras.

Por otra parte, se sabe que la progesterona es el principal esteroide del microambiente del huevo en el momento de la ovulación y ha mostrado ser un buen attractante de espermatozoides.

25

En los documentos de patentes PCT WO 02/090373, WO 00/09648 y WO 99/66331 se divulgan métodos y dispositivos para evaluar la quimiotaxis de espermatozoides, los cuales constan básicamente de dos compartimientos verticales separados por un filtro, donde el attractante se coloca en el inferior y los espermatozoides en el superior. La utilidad secundaria que le otorgan al dispositivo sería la de evaluar quimiotaxis, basado en la acumulación de espermatozoides obtenida al cabo de un tiempo en el compartimiento que contiene el attractante. Esta metodología no permite diferenciar quimiotaxis de otros procesos que provocan acumulación celular.

30

El documento de patente PCT WO 2005/027634 propone otro método para aislar espermatozoides capacitados. La selección espermática se realiza en base a la capacidad de los espermatozoides de responder a un gradiente de temperatura, es decir que, nadan de un lugar más frío a uno más cálido. El dispositivo cuenta con un sistema externo de calentamiento diferencial del fluido de cada compartimiento. Cada compartimiento requiere la regulación de la temperatura con una diferencia de tan solo 2°C entre ambos, ubicados a una distancia de 1 mm. Esta particularidad física se logra con un equipo adicional de regulación térmica, lo cual dificulta notablemente la manipulación del dispositivo en cuestión. La eficiencia del enriquecimiento es del 10%.

35

La patente WO 2005/009222 propone un método sólo para diagnosticar el estado fisiológico de una muestra de semen basado en la detección del nivel espermatozoides capacitados. El invento propone un protocolo que involucra la muerte celular, el cual solo serviría para diagnosticar una muestra, ya que los espermatozoides capacitados no podrían ser recuperados para su posterior uso en fecundación asistida.

45

La patente US 5.849.713 se relaciona con factores de quimiotáctica para espermatozoides humanos. La actividad quimiotáctica se determina por un ensayo capilar descrito allí.

50

El artículo "Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa" de Teves et al. publicado en "Fertility and Sterility", Vol. 86, nro. 3 en 2006, divulga, por medio de un sistema de videomicroscopía y un análisis de imagen por computadora, ensayos de quimiotaxis para detectar quimiotaxis verdadera en espermatozoides humanos, en paralelo a la detección de inmunohistoquímica de progesterona dentro de células del cumulus.

55

El artículo "Applications of a microfabricated device for evaluating sperm function" de Kricka et al. publicado en "Clinical Chemistry", Vol. 39, nro. 9 en 1993 divulga inter alia la valoración simultánea de la potencia de diferentes espermicidas y concentraciones de espermicida utilizando estructuras que comprenden compartimentos que contienen espermicida conectados por canales a un compartimento central en el cual se introduce semen.

60

El artículo "Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex" de Guirobaldi et al. publicado en "PLOS ONE", Vol. 3, nro. 8 en 2008 divulga la identificación de quimiotaxis de esperma en mamíferos hacia varias fuentes femeninas como fluido folicular, fluido de oviducto, y medio acondicionado del cumulus oophorus y el ovocito.

65

El artículo "Chemotaxis assays of mouse sperm on microfluidic devices" de Koyama et al. publicado en "Analytical Chemistry", Vol. 78, nro. 10, en 2006 divulga un dispositivo microfluídico para medir quimiotaxis de espermatozoides.

El artículo "Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay" de Fabro et al. publicado en "Biology of Reproduction", Vol. 67, nro. 5 en 2002 divulga quimiotaxis de espermatozoides hacia factor(es) en fluido folicular en humanos y ratones.

5

Breve descripción de la invención

En la presente invención se muestra un dispositivo para diagnosticar el estado fisiológico y/o seleccionar espermatozoides de una muestra de semen en base a quimiotaxis, del tipo que posee dos compartimentos (1a, 1b) comunicados entre sí, en donde dicha comunicación de compartimentos (1a, 1b) se realiza a través de un conducto o puente (2) posicionado inferiormente, y por encima del nivel inferior de los mencionados compartimentos (1a, 1b); posicionándose en las entradas de dichos compartimentos (1a, 1b) correspondientes medios de cierre (3, 4) y correspondientes conductos de egreso de aire (5) que comunican el extremo superior de los compartimentos (1a, 1b) con el exterior, en donde dichos medios de cierre (3, 4) están compuestos por un tapón con un apéndice (3) y un anillo elástico (4) y en donde el extremo inferior de los compartimentos (1a, 1b) tiene una base cónica. Preferentemente, el anillo elástico es de goma y dichos compartimentos (1a, 1b), puente (2) y conductos de egreso de aire (5) están conformados en un cuerpo de material acrílico biocompatible transparente.

En la presente invención se muestra un procedimiento para diagnosticar el estado fisiológico y/o seleccionar los mejores espermatozoides de una muestra de semen en base a quimiotaxis usando el dispositivo de acuerdo con la invención, que comprende llevar a cabo las siguientes etapas:

- a) colocar un medio de cierre (3) en uno de los compartimentos (1a);
- b) llenar el puente (2) vertiendo el medio de cultivo a través del compartimiento restante (1b);
- c) colocar la suspensión de espermatozoides en el compartimiento (1b) sin medio de cierre y colocar el medio de cierre (3);
- d) extraer el medio de cierre (3) del primer mencionado compartimiento (1a) y llenar con medio de cultivo o medio attractante;
- e) incubar el dispositivo;
- f) recuperar la solución del compartimiento (1a);

En una variante de realización del procedimiento anterior, es posible adicionarlas etapas de: g) colocar el tapón en dicho compartimiento (1a); h) destapar el compartimiento (1b); y i) recuperar la solución del compartimiento (1b).

Breve descripción de las figuras

A fin de hacer más inteligible el objeto de la presente invención, ha sido ilustrado con una figura esquemática, en su forma de realización preferida, las cuales asumen un carácter de ejemplo demostrativo, en donde:

Las figuras 1a, 1b y 1c ilustran respectivas vistas superior, frontal y lateral del dispositivo de la presente invención;

La figura 2 muestra un corte según la línea A-A de la figura 1c;

La figura 3 muestra un corte según la línea A-A de la figura 1c con la incorporación de un medio de cierre;

La figura 4 muestra un gráfico de la concentración óptima de espermatozoides (E) utilizados en la separación espermática. Los valores representan la Media \pm SEM del porcentaje de espermatozoides acumulados en el compartimiento 1a por quimiotaxis; (n= 3). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. 6- millones E/ml.

La figura 5 muestra un gráfico de la concentración de Progesterona empleada en la separación espermática. Los valores representan la Media \pm SEM del porcentaje de espermatozoides acumulados en el compartimiento 1a por quimiotaxis; (n= 3). * $p < 0.01$ vs. 10 pM de progesterona.

La figura 6 muestra un gráfico de los tiempos de incubación empleados para la separación espermática. Los valores representan la Media \pm SEM del porcentaje de espermatozoides acumulados en el compartimiento 1a por quimiotaxis; (n= 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. 20 min.

La figura 7 muestra un gráfico de la separación espermática utilizando el dispositivo diseñado por nosotros con las condiciones para obtener una respuesta máxima (6-10⁶ millones E/ml, 10 pM de progesterona, y 20 minutos de incubación), descritas arriba e ilustradas en las figuras 4 a 6, respectivamente. Los valores representan la Media \pm SEM, del porcentaje de espermatozoides acumulados en el compartimiento 1a por quimiotaxis; La proporción de

65

espermatozoides acumulados por quimiotaxis en el compartimiento con progesterona es de aproximadamente 10% (Δ ; n= 5). ** p<0.01 vs. Control.

5 Para verificar que la separación espermática se realiza por quimiotaxis y no por otros mecanismos espermáticos (por ejemplo, hiperactivación, quimioquinesis, etc.), se realizaron pruebas adicionales.

10 La figura 8 muestra el porcentaje de espermatozoides acumulados (Media \pm SEM; n=3) en el compartimiento 1a por quimiotaxis cuando las células se trataron previamente con un inhibidor (ddAdo) de una enzima (mAC) que participa en la señal quimiotáctica. En presencia del inhibidor, no se observa acumulación espermática debida a quimiotaxis (* p<0.05).

15 La figura 9 muestra el porcentaje de espermatozoides acumulados (Media \pm SEM; n=3) en el compartimiento 1a por quimiotaxis cuando las células se trataron previamente con el anticuerpo "c262" contra el receptor de progesterona (Ac anti PR). En presencia del anticuerpo los espermatozoides no se acumulan en el compartimiento 1a (* p<0.05), mientras que el tratamiento con un anticuerpo inespecífico (Ac anti IgG) no anula la acumulación espermática.

20 En la figura 10 el porcentaje de espermatozoides acumulados en presencia de un gradiente ascendente de progesterona fue similar al observado en un gradiente descendente del atrayente, mientras que la ausencia de gradiente de progesterona (igual concentración de la hormona en ambos compartimientos 1a y 1b) la acumulación espermática se encuentra reducida (* p<0.05).

25 En la figura 11 se compara la proporción de espermatozoides acumulados por quimiotaxis por medio del método de la invención, con el porcentaje de espermatozoides quimiotácticos determinado por videomicroscopia y análisis computarizado de imágenes. Se observa una correlación alta y significativa entre ambos métodos. (r=0.794; p<0.05; n=6).

30 La figura 12 muestra la correlación entre la proporción de espermatozoides que realizan la Reacción Acrosómica (RA) inducida y la proporción de espermatozoides acumulados por quimiotaxis por el método de la invención. Los valores representan la Media \pm SEM (n= 5). (r=0.947;p<0.05; n=5).

Los resultados de las figuras 8 a 12 confirman que la acumulación de espermatozoides por el método de la invención es debida a quimiotaxis.

35 Una aplicación de la invención es utilizar el método para diagnosticar el estado fisiológico y/o seleccionar los mejores espermatozoides de una muestra de semen.

40 La figura 13 muestra el Índice de Enriquecimiento en espermatozoides capacitados antes y después de la separación espermática. Los valores representan la Media \pm SEM (n= 9), donde el valor antes de la separación espermática representa el 100% a partir del cual se estima cuantas veces se incrementó la proporción de espermatozoides capacitados después de la separación espermática por quimiotaxis. En muestras de semen definidas como normales la proporción de espermatozoides capacitados obtenida después de la separación espermática mediante la invención se incrementa en promedio un 200% (*p<0.05 vs. antes de la separación). Cuando la invención se aplica con muestras de pacientes subfértiles (T: teratozoospermico, A-T: asteno - teratozoospermico, O: oligozoospermico, ESCA: esterilidad sin causa aparente), es posible lograr después de la separación espermática, una tasa de enriquecimiento en espermatozoides capacitados similar al observado en las muestras normales. Es decir que, independientemente de la patología que presente la muestra de semen, el uso de la invención permite a las muestras subfértiles mejorar la calidad de las mismas.

50 La figura 14 muestra el rango de valores máximos y mínimos del índice de enriquecimiento en espermatozoides capacitados alcanzado luego de la separación espermática ("Después"), llevada a cabo con la invención en muestras de semen normal (n=8) y de pacientes subfértiles (T: teratozoospermico, n=29; A-T: asteno - teratozoospermico, n=15; O: oligozoospermico, n=2; ESCA: esterilidad sin causa aparente, n=3). En las muestras normales se observa que todas mejoran la tasa de enriquecimiento al menos en un 100% en comparación con antes de la separación, llegando a superar los valores antes de la separación hasta un 600%. También se observa que, si bien todas las muestras patológicas lograron un enriquecimiento en espermatozoides capacitados superior al observado antes ("Antes") de la separación espermática, aproximadamente en un 30% de estas muestras el nivel de enriquecimiento fue inferior al 100%. Esta observación permite la utilización de la invención con fines diagnóstico, especialmente en las muestras tipo ESCA donde los test diagnóstico convencionales no permiten identificarlas como subfértiles.

60 Descripción detallada de la invención

65 El dispositivo aquí propuesto (dos compartimientos separados por un espacio donde se forma el gradiente del atrayente) ha sido diseñado en función de las características físico-químicas del atrayente donde la longitud del puente (2mm) y el tiempo de incubación del sistema armado (20 min) están adaptados para utilizar la concentración

quimiotáctica de progesterona (10pM), permitiendo la formación de un gradiente de concentración de este atractante.

5 El presente dispositivo evita el flujo en masa de los espermatozoides de un compartimiento al otro por un efecto físico de vasos comunicantes, de esta manera se asegura que el proceso se debe solo a la acción química del atractante. En otras palabras, la mera conexión de dos compartimientos donde se coloquen los espermatozoides en uno de ellos y en el otro el atractante, de manera que se forme un gradiente de concentración entre ambos, no garantiza en lo absoluto la evaluación del proceso de quimiotaxis. Esto se garantiza entonces con un dispositivo que tiene las características de poseer un cierre hermético compuesto por un anillo elástico (4) que asienta en la parte superior de los compartimientos 1a y 1b, un par de tapones (3) que asientan en el anillo elástico (4), un par de orificios (5) ubicados por encima del anillo elástico (4) que permiten que el aire empujado al introducir el tapón salga al exterior en lugar de empujar el líquido de 1b hacia 1a. Estas adaptaciones de la invención se complementan con la secuencia de llenado del dispositivo.

15 Asimismo la secuencia o método de uso del dispositivo propuesto además de diagnosticar el estado fisiológico de una muestra de semen dada, permite seleccionar y aislar en el mismo procedimiento los mejores espermatozoides. El presente dispositivo permite retirar el contenido o solución del compartimiento 1a y diagnosticar el estado fisiológico de la muestra de semen. A los efectos de la presente solicitud se entiende por diagnosticar el estado fisiológico de una muestra a la valoración de la capacidad de respuesta quimiotáctica que presentan los espermatozoides en presencia de un atractante fisiológico, la progesterona. Para ello se determina la proporción neta de espermatozoides acumulados en el compartimiento que contiene la progesterona (1a). Si bien este tipo de ensayo permite evaluar todo tipo de muestras subfértiles, la invención será particularmente útil para valorar el estado fisiológico de las muestras tipo ESCA dado que los ensayos diagnóstico de rutina no permiten identificar patologías en las mismas.

25 El fundamento de este método se basa en la particularidad de los espermatozoides de mamífero de orientar su movimiento hacia la fuente de producción de un atractante. Esta capacidad quimiotáctica la pueden ejercer sólo aquellos espermatozoides que han completado el proceso de "capacitación", condición que los habilita para fertilizar el ovocito. Por lo tanto, el contenido del compartimiento 1a también puede ser utilizado para seleccionar y/o separar espermatozoides capaces de fertilizar óvulos, en donde los espermatozoides así seleccionados puedan ser empleados en las técnicas de fertilización asistida.

35 Es fundamental que el dispositivo conste de dos compartimientos, uno donde se colocan los espermatozoides y en el otro el atractante, de manera que entre ambos se forme un gradiente de concentración del atractante. Al cabo de un tiempo, los espermatozoides capacitados que se dirigen quimiotácticamente hacia la fuente del atractante y se acumulan en el compartimiento que contiene el atractante (1a), es decir que, en este último habrá un enriquecimiento de espermatozoides capacitados comparado con la muestra de semen original. De esta manera, la selección y acumulación de los espermatozoides capacitados se realiza en forma fisiológica mediante el reclutamiento mediado por quimiotaxis.

40 Con el presente dispositivo se logra un enriquecimiento en espermatozoides capacitados que puede ser hasta un 600% superior al de la muestra de semen original. Dicho enriquecimiento fue verificado determinando la proporción de espermatozoides que realizan la reacción acrosómica inducida farmacológicamente, procedimiento conocido como indicador de capacitación (Figuras 13 y 14).

45 El presente dispositivo combina una disposición en dos compartimientos con un gradiente de un atractante, y dimensiones adaptadas para un atractante que es efectivo a bajas concentraciones, por ejemplo valores entre 1 y 100 pM de progesterona, lográndose así una alta eficiencia en la selección de los mejores espermatozoides, los capacitados.

50 En una realización preferida el dispositivo puede tener dimensiones particulares adaptadas a las características de la progesterona (su capacidad para difundir y formar un gradiente de concentración, y su efectividad a bajas concentraciones). Por ejemplo, el tamaño del puente conector entre ambos compartimientos puede ser de alrededor de 2 mm de diámetro por alrededor de 2 mm de largo.

55 Por tratarse el dispositivo de un sistema de vasos comunicantes, al momento de colocar un líquido en uno de los compartimientos, el fluido tiende a pasar al otro compartimiento a través del puente, hasta que las alturas de los volúmenes se igualen. Este fenómeno no es deseable que ocurra, ya que rompe la formación del gradiente del atractante y a su vez traslada mecánicamente, es decir en forma no fisiológica, a los espermatozoides hacia el compartimiento que contiene el atractante.

60 Para evitar este último problema, el dispositivo está provisto por un sistema de cierre hermético. Opcionalmente, ambos compartimientos del dispositivo tienen una base cónica, en donde la inserción del puente conector entre ambos compartimientos está por encima de dicho cono. Las base cónica permite que los espermatozoides muertos o con baja movilidad decanten al fondo del tubo por simple gravedad, evitando ser arrastrados dentro del puente y hacia el otro compartimiento, por los espermatozoides quimiotácticos con mayor velocidad.

El presente dispositivo confiere las condiciones de hermeticidad necesarias para evitar el movimiento de fluidos en un sistema tan pequeño y evitar además la contaminación externa.

5 En resumen, el dispositivo aquí propuesto permite diagnosticar y seleccionar los mejores espermatozoides en un solo paso, en forma sencilla, económica y con alta eficiencia, pudiendo el mismo ser realizado en menos de una hora por personal con conocimientos elementales de laboratorio.

10 En relación a las aplicaciones del dispositivo propuesto, se prevé su utilización para diagnosticar el estado fisiológico de una muestra de semen dada, al mismo tiempo que permite reclutar los mejores espermatozoides para posteriormente utilizarlos para mejorar las tasas de fertilización.

15 Cabe destacar, que las pruebas de comprobación del método propuesto se realizaron utilizando una metodología de determinación de respuesta quimiotáctica de los espermatozoides que es muy sofisticada y requiere de equipo costoso y personal altamente entrenado.

20 Se observa en las figuras 1 a 3 que el dispositivo, fabricado preferentemente en acrílico, de material biocompatible y necesariamente transparente para un uso eficiente del dispositivo, consta de dos compartimientos verticales cilíndricos "1a" y "1b", de una longitud preferente de 12 mm de largo por 4 mm de diámetro (capacidad equivalente a 130 μ l), conectados entre sí por un tubo ó puente "2", de 2 mm de largo por 2 mm de diámetro (capacidad equivalente a 20 μ l).

25 En uno de los compartimientos, por ejemplo "1b", se coloca la suspensión que contiene a los espermatozoides y en el otro, "1a", el attractante. A lo largo del puente 2 se irá formando un gradiente de concentración ascendente del attractante, que permite seleccionar a los espermatozoides mediante quimiotaxis, los cuales se acumulan en el compartimiento 1a del attractante.

30 En una realización preferida las dimensiones del presente dispositivo están adaptadas para el uso de la progesterona como attractante, y para minimizar el volumen a colocar en cada uno de los compartimientos. Es evidente para un experto en el arte que el attractante puede ser cualquier quimioattractante que sea efectivo a bajas concentraciones por ejemplo concentraciones en el orden de picomoles.

35 Por tratarse de un sistema de vasos comunicantes, un aspecto importante es evitar el flujo de los fluidos a través del puente 2 durante el llenado y vaciado de los compartimientos "1a" y "1b". Este efecto indeseable podría romper el gradiente del attractante, perdiéndose así el principio de funcionamiento del dispositivo, o también trasladar mecánicamente el contenido de un compartimiento dentro del otro, lo cual también disminuiría notablemente la eficiencia del dispositivo.

40 Para evitar estos inconvenientes, se proveen de medios para el cierre hermético de los compartimientos, combinando la adaptación del presente dispositivo con una particular secuencia de cerrado.

45 En cada compartimiento, "1a" o "1b", estos medios de cierre están compuestos por un tapón con un apéndice "3" que se asienta sobre un anillo elástico de goma "4", sobre el cual se produce el cierre hermético. Además se provee de un orificio "5" ubicado en la parte superior de cada compartimiento "1a" y "1b", entre el tapón "3" y el anillo de goma "4", que permite la salida constante del aire contenido en el mismo durante la colocación del tapón "3", a fin de poder cerrar herméticamente el compartimiento "1a" ó "1b".

50 Otro detalle del dispositivo lo presenta la terminación cónica "6" de la base de cada compartimiento el cual se ubica por debajo de la conexión del puente donde se forma el gradiente por donde migran los espermatozoides nadando. Esta adaptación permite que los espermatozoides muertos o de baja movilidad decanten por gravedad al fondo del compartimiento, evitando así ser arrastrados por los espermatozoides móviles dentro del puente.

En relación al modo de uso del presente dispositivo, se describe a continuación su operatoria:

55 La separación de los espermatozoides (E) móviles del plasma seminal se realiza por la técnica de Percoll. Para ello se emplea un volumen aproximado de 2 ml de semen, el cual se deposita sobre 1 ml del gradiente de Percoll (capa inferior: 500 μ l Percoll 95%, capa superior: 500 μ l de Percoll 47.5%, en HAM-F10). Luego de centrifugar 20 minutos a 1.800 rpm, se recupera el pellet de células el cual se lava dos veces por centrifugación durante 7 min a 1.000 rpm, con medio HAM-F10. Por último, el pellet recuperado se resuspende en 1 ml de medio HAM-F10, se realiza el recuento de células en cámara de recuento celular y se ajusta el volumen de modo de obtener una concentración de 8 millones E/ml. La capacitación de los E se realiza en medio HAM-F10 suplementado con albúmina sérica humana (HSA) al 1%, durante 4 horas a 37 °C, bajo atmósfera de 5 % de CO₂ en aire.

65 Al finalizar el tiempo de capacitación, se ajusta la concentración de E de modo de obtener 6 millones E móviles/ml, y se procede a armar dos dispositivos como el descrito en la sección precedente (figuras 1-3), uno sin attractante como control negativo, y el otro con progesterona como attractante.

5 Para armar el dispositivo control, un dispositivo tal como el descrito en las figuras 1 a 3, se procede de la siguiente manera: 1) se coloca el tapón en el compartimiento 1a donde se colocará el medio de cultivo (HAM-F10/1%HSA), 2) se llena con medio de cultivo el puente que une los dos compartimientos, 3) se coloca la suspensión de E en el compartimiento 1b (130 μ l de la solución 6 millones E móviles/ml) y se cierra este compartimiento con el tapón, 4) se destapa el compartimiento 1a y se llena con medio de cultivo (130 μ l).

10 Para el armado del dispositivo con el atractante se prepara otro dispositivo tal como el descrito en las figuras 1 a 3, de igual modo que el dispositivo control reemplazando el medio de cultivo por una solución 10 pM de Progesterona diluida en medio de cultivo. Una vez armados los dos dispositivos ("Control" y "Atractante"), se incuban durante 20 minutos a 37°C, bajo atmósfera de 5 % de CO₂ en aire.

15 Para desarmar el dispositivo y recuperar los mejores espermatozoides se procede a retirar la solución del compartimiento (1a) que contiene el medio de cultivo o el atractante. Con la suspensión de espermatozoides retirados del compartimiento 1a de ambos dispositivos (control y atractante) se realiza el recuento celular en una cámara de recuento celular. Luego se determina la diferencia en el porcentaje de E hallados en cada uno de estos dos compartimientos, lo cual permite valorar el porcentaje neto de E que migraron al compartimiento que tiene el atractante ("Δ").

20 Una vez concluida la etapa de diseño del dispositivo, a continuación se procedió a realizar una serie de experimentos con el fin de definir las condiciones experimentales del uso del mismo, para luego proceder a la validación del método.

25 Las mejores condiciones experimentales con las cuales se obtuvo una óptima separación espermática, (evaluada como la diferencia "Δ" entre la proporción de E que se acumulan en el compartimiento con medio de cultivo y en el que tiene el atractante), fueron: 1) una suspensión con una concentración de alrededor de 6 millones de E/ml (Fig. 4), 2) una concentración de alrededor de 1 a 100 pM de progesterona (Fig. 5), y 3) una incubación del dispositivo durante alrededor de 20 minutos (Fig. 6).

30 A continuación, la validación del método para diagnóstico (basado en la respuesta quimiotáctica de los E) se realizó de tres formas: 1) por inhibición de la respuesta quimiotáctica inhibiendo una enzima, la mAC, que participa en la señalización quimiotáctica, 2) por inhibición de la respuesta quimiotáctica bloqueando el receptor para progesterona ubicado en la membrana del espermatozoide, 3) por comparación con un gradiente descendente de progesterona y exposición a ausencia de gradiente de progesterona, 4) por comparación con la determinación de quimiotaxis por videomicroscopía, y 5) por comparación con nivel de reacción acrosómica (RA) inducida. La separación espermática mediada por quimiotaxis hacia la progesterona permitió observar una subpoblación de espermatozoides que migró significativamente hacia la Progesterona ($9\pm 0.4\%$; $p < 0.01$; Fig. 7 "Δ"). Dicha población celular se correlacionó con el porcentaje de espermatozoides quimiotácticos evaluado por videomicroscopía ($r = 0.79$, $p < 0.01$; Fig. 11) y de RA inducida ($r = 0.94$, $p < 0.05$; Fig. 12). La proporción de espermatozoides acumulados por un gradiente ascendente de progesterona fue similar a la observada con un gradiente descendente de progesterona, no observándose acumulación espermática en ausencia de gradiente de progesterona ($p < 0.001$; Fig. 10). La acumulación espermática por quimiotaxis se anuló al inhibir una enzima participante en el proceso celular como también al bloquear la actividad del receptor de la progesterona ($p < 0.05$; Fig. 8 y 9).

45 La validación del método para seleccionar los mejores espermatozoides se realizó calculando el porcentaje de incremento en el valor del nivel de reacción acrosómica inducida, en la población de espermatozoides obtenida luego de la separación espermática, y en comparación con el valor obtenido en la muestra de espermatozoides antes de la separación, considerada esta última como el 100%. Los resultados mostraron que el nivel de enriquecimiento en espermatozoides capacitados luego de la separación espermática puede alcanzar hasta un 50 600% (Fig. 13 y 14).

55 En resumen, el diseño del dispositivo el cual involucra la adaptación de sus dimensiones al atractante a utilizar, un cierre hermético, y la definición de la secuencia precisa de llenado y vaciado, las que dotan a este dispositivo y al procedimiento de características únicas, dando como resultado un mejoramiento sustancial en la eficiencia del diagnóstico y la selección o separación de los mejores espermatozoides.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para diagnosticar el estado fisiológico y/o seleccionar espermatozoides de una muestra de semen en base a quimiotaxis, del tipo que posee dos compartimentos (1a, 1b) comunicados entre sí, caracterizado porque dicha comunicación de compartimentos (1a, 1b) se realiza a través de un conducto o puente (2) posicionado inferiormente, y por encima del nivel inferior de los mencionados compartimentos (1a, 1b); posicionándose en las entradas de dichos compartimentos (1a, 1b) correspondientes medios de cierre (3, 4) y correspondientes conductos de egreso de aire (5) que comunican el extremo superior de los compartimentos (1a, 1b) con el exterior, en donde dichos medios de cierre (3, 4) están compuestos por un tapón con un apéndice (3) y un anillo elástico (4) y en donde el extremo inferior de los compartimentos (1a, 1b) tienen una base cónica (6).
2. Dispositivo, de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizado porque dichos compartimentos (1a, 1b), puente (2) y conductos de egreso de aire (5) están conformados en un cuerpo de material acrílico biocompatible transparente.
3. Dispositivo, de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizado porque dichos compartimentos (1a, 1b) presentan una longitud de 12 mm y un diámetro de 4 mm con extremos base cónicos y una capacidad equivalente a 130 µl, y el conducto ó puente (2) posee 2 mm de longitud y un diámetro de 2 mm con una capacidad equivalente a 20 µl.
4. Dispositivo, de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizado porque está fabricado en material acrílico biocompatible y necesariamente transparente para un uso eficiente del dispositivo.
5. Procedimiento para diagnosticar el estado fisiológico y/o seleccionar espermatozoides de una muestra de semen en base a quimiotaxis utilizando el dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende llevar a cabo las siguientes etapas:
- a) colocar un medio de cierre (3) en unos de los compartimentos (1a);
 - b) llenar el puente (2) vertiendo el medio de cultivo o medio attractante a través del compartimiento restante (1b);
 - c) colocar la suspensión de espermatozoides en el compartimiento (1b) sin medio de cierre y colocar el medio de cierre (3);
 - d) extraer el medio de cierre (3) del primer mencionado compartimiento (1a) y llenar con medio de cultivo o medio attractante;
 - e) incubar el dispositivo.
 - f) recuperar la solución del compartimiento (1a);
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 caracterizado porque posterior a la etapa "f" se realizan las siguientes etapas:
- g) colocar el tapón en dicho compartimiento (1a);
 - h) destapar el compartimiento (1b);
 - i) recuperar la solución del compartimiento (1b).
7. Procedimiento de acuerdo con las reivindicación 5, caracterizado porque el attractante es progesterona.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el semen es semen de un mamífero
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el semen es semen de especies de otros grupos zoológicos.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el medio attractante comprende progesterona a una concentración entre 1 a 100-pM.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque la etapa e) de incubado se lleva a cabo durante un periodo de tiempo entre 10 y 30 minutos a una temperatura de 37°C y en un ambiente con 5% de CO₂ en aire.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque la suspensión de espermatozoides de la etapa c) tiene una concentración de espermatozoides de entre 1x10⁶ y 9,9x10⁶ de espermatozoides móviles/ml.

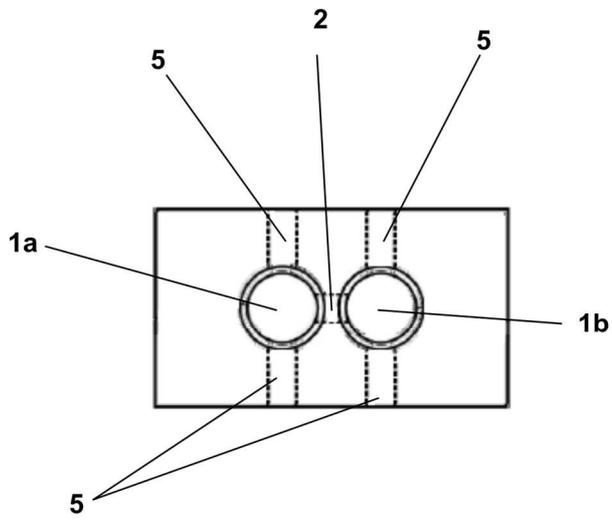


FIG. 1a

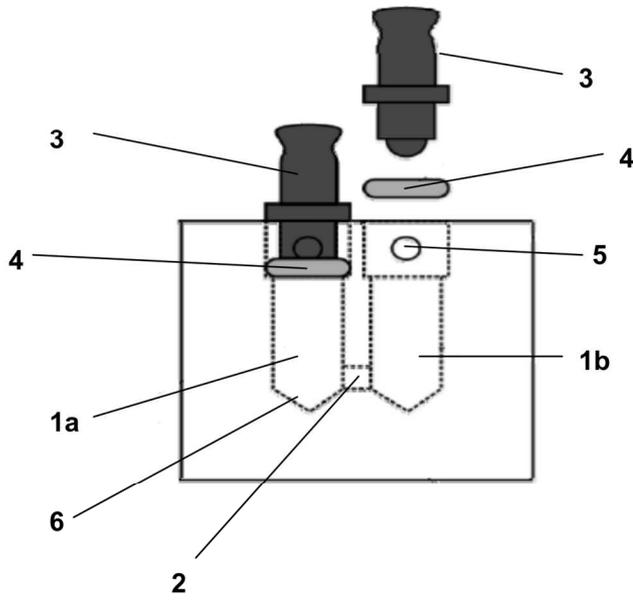


FIG. 1b

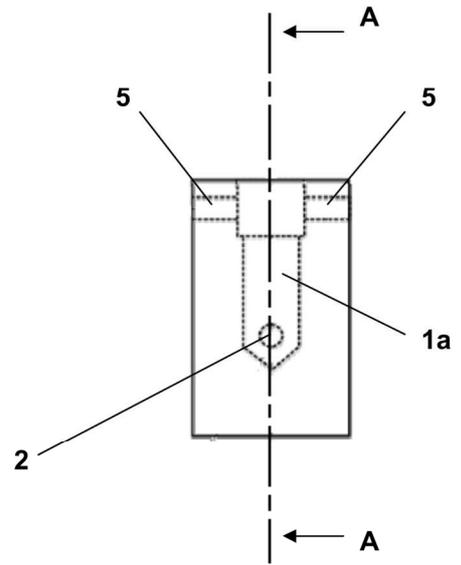
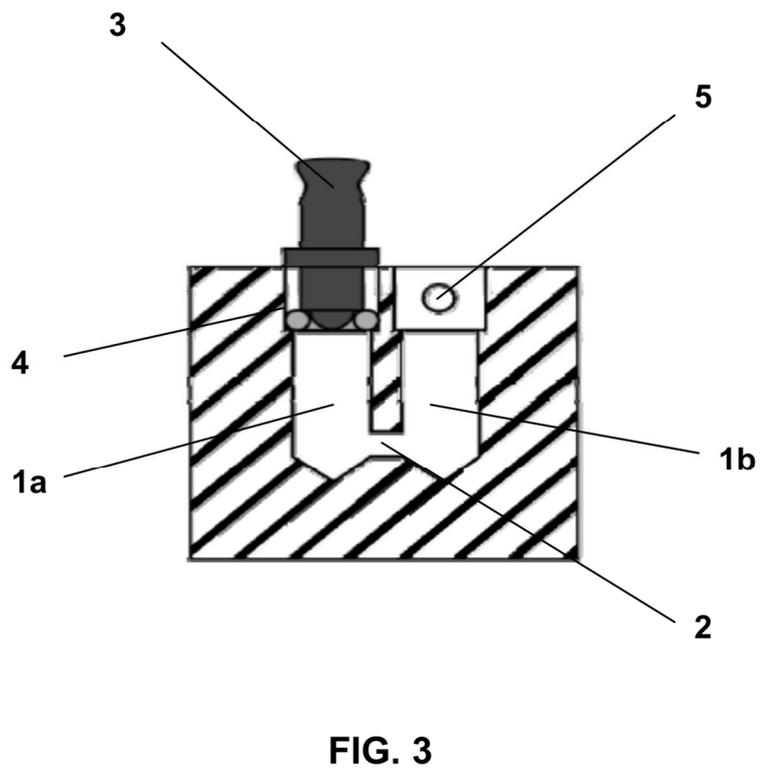
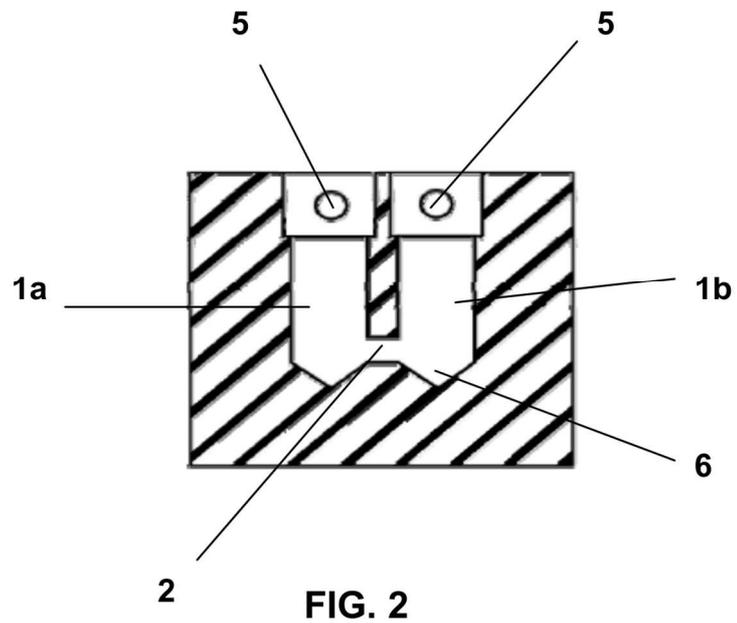


FIG. 1c



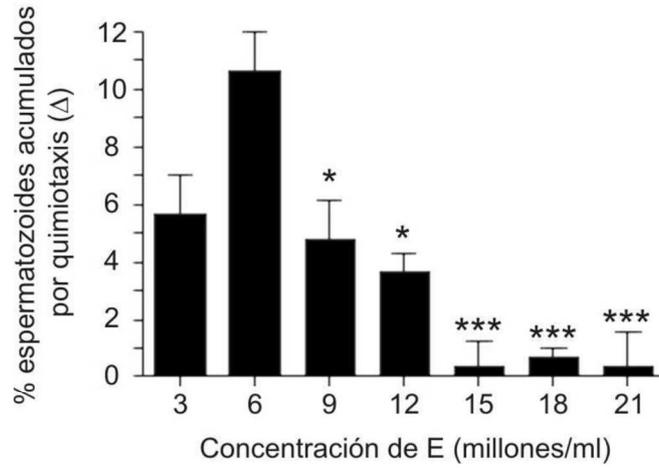


Figura 4

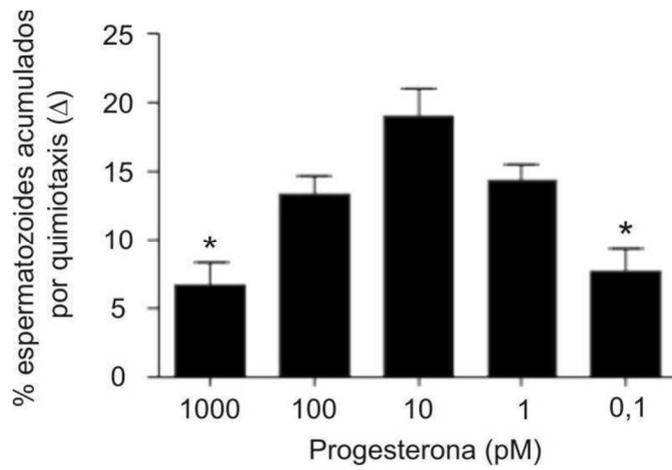


Figura 5

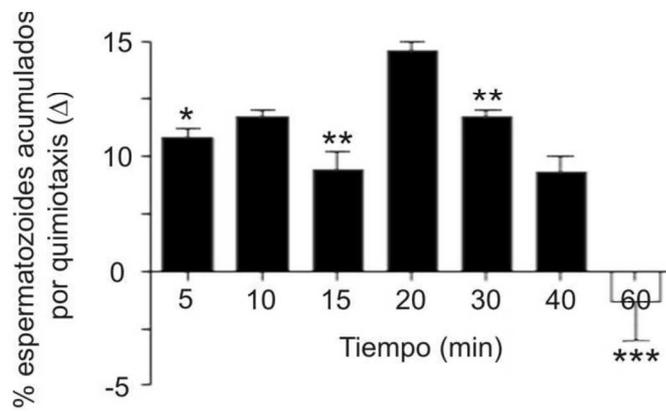


Figura 6

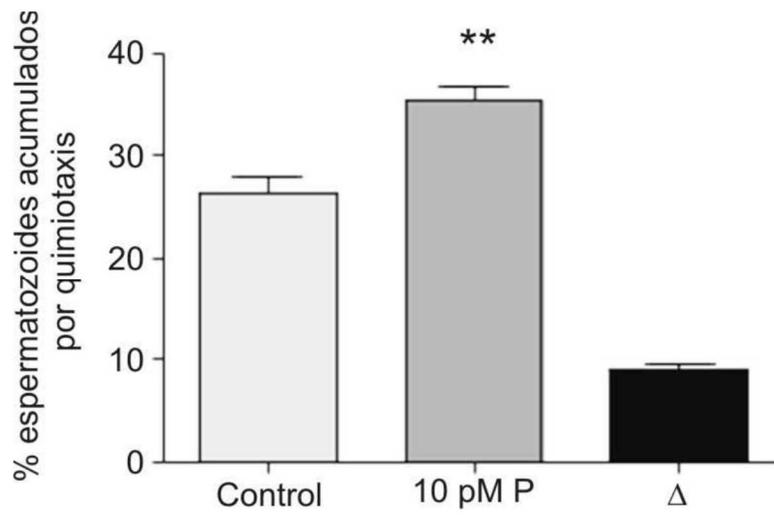


Figura 7

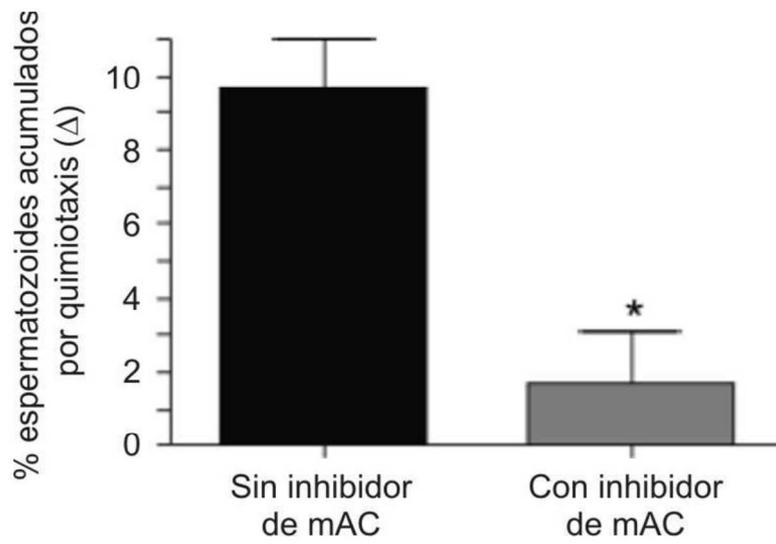


Figura 8

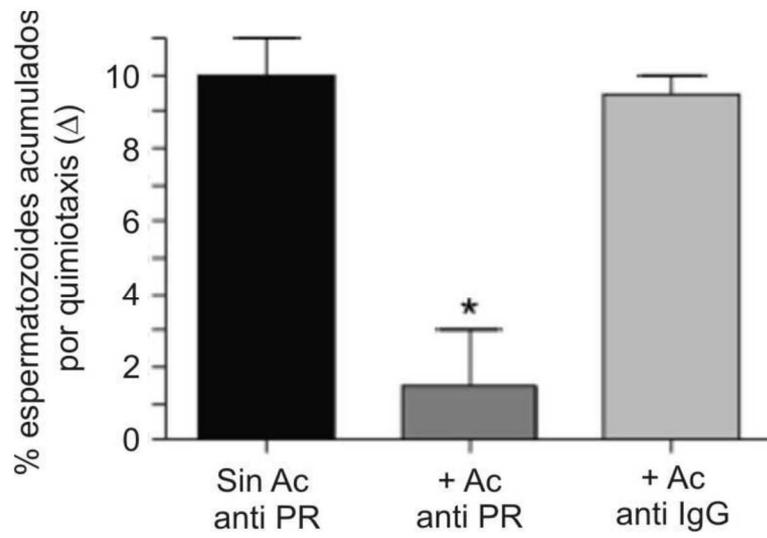


Figura 9

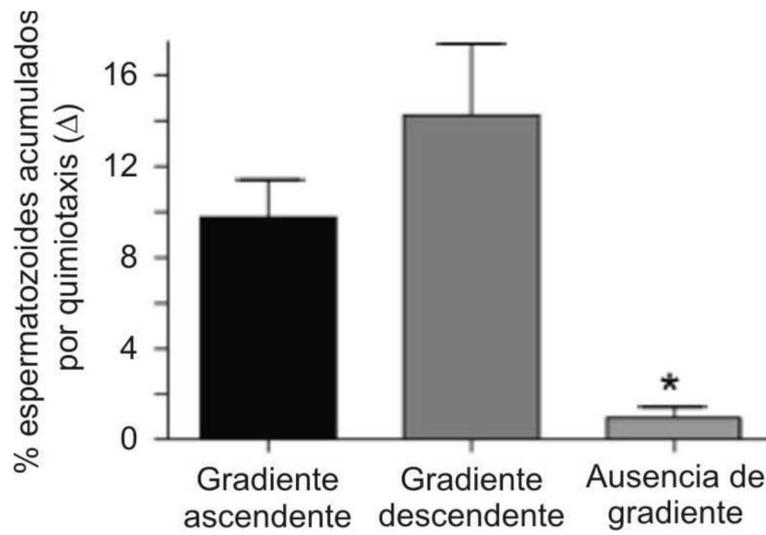


Figura 10

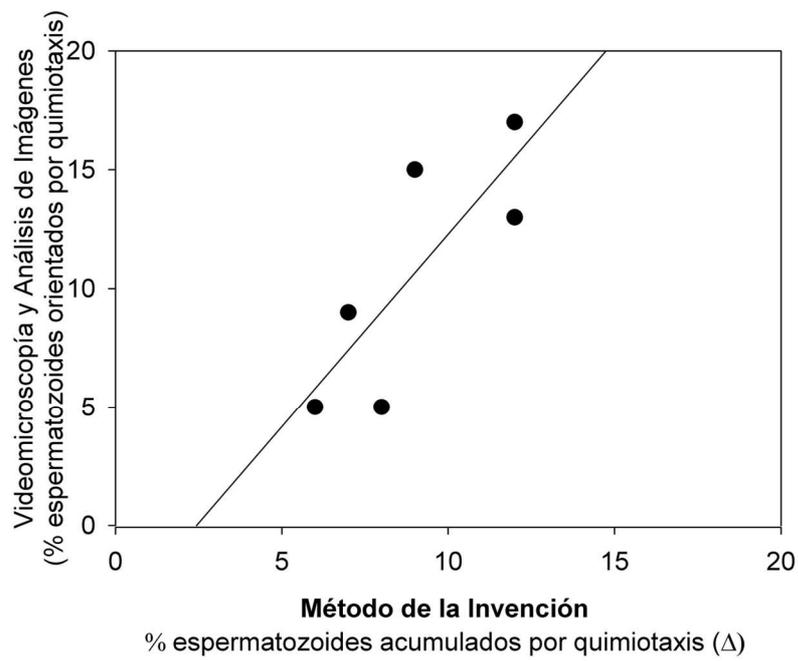


Figura 11

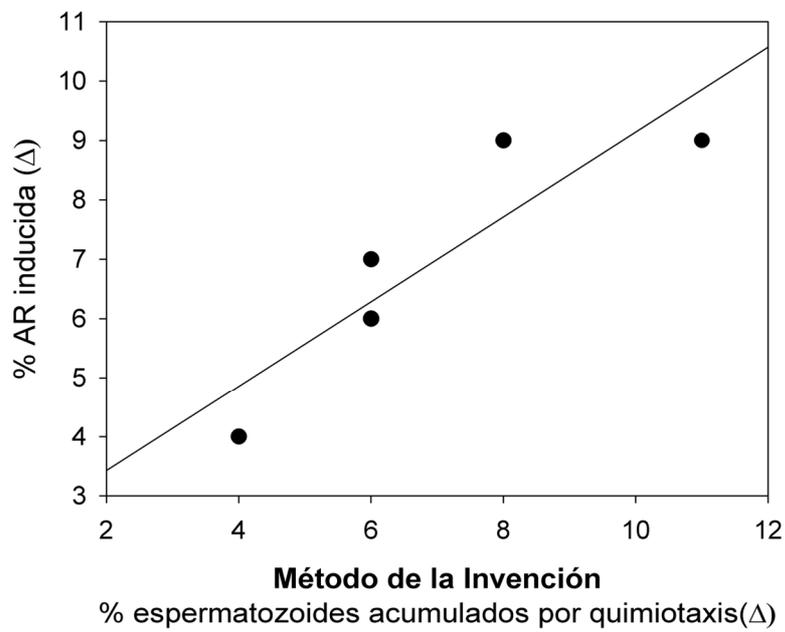


Figura 12

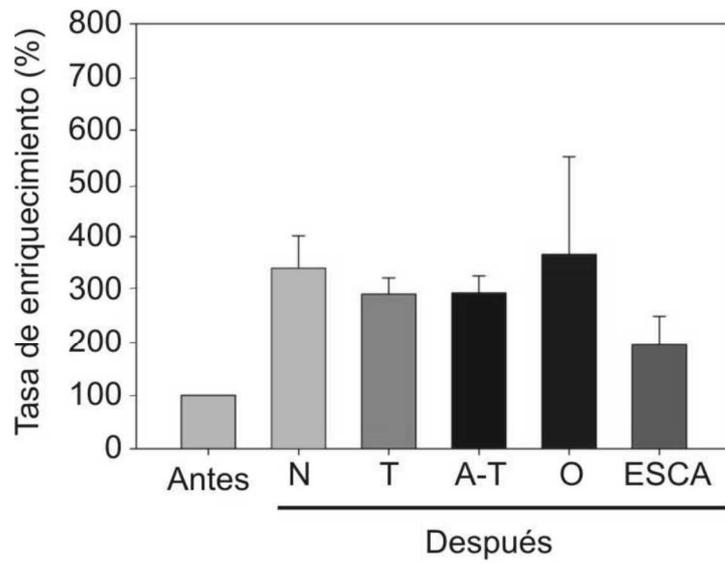


Figura 13

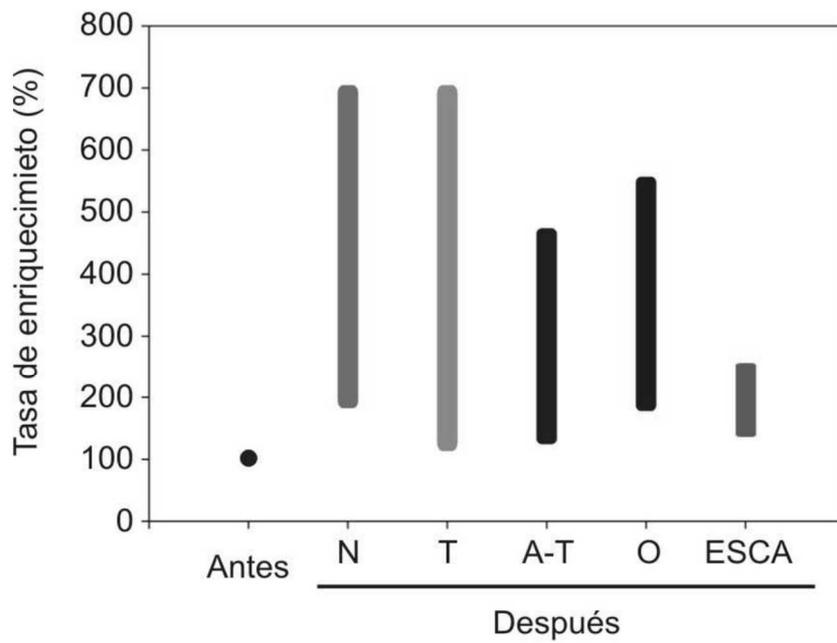


Figura 14