

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 041**

51 Int. Cl.:

C12N 5/076 (2010.01)

C12M 3/00 (2006.01)

A61B 17/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2011 E 11767394 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2614142**

54 Título: **Método para el enriquecimiento de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN y reducción de los riesgos de anomalías y/o aneuploidía**

30 Prioridad:

09.09.2010 EP 10009406

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

14.08.2015

73 Titular/es:

**ZECH, JOSEF (100.0%)
Brennerstrasse 15
6020 Innsbruck, AT**

72 Inventor/es:

ZECH, JOSEF

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 543 041 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

Método para el enriquecimiento de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN y reducción de los riesgos de anomalías y/o aneuploidía

5 La presente invención se refiere a un método para producir una muestra enriquecida de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN o, en particular, una muestra enriquecida de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN humano, que se puede utilizar adicionalmente en la tecnología de reproducción artificial (es decir, fertilización *in vitro* (FIV), inseminación) o métodos de diagnóstico. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para producir una o más muestras enriquecidas de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN, p. ej., fluido seminal (incluyendo pero no limitado a muestras de esperma/fluido seminal de una calidad deficiente). Dicho método emplea
10 un dispositivo de selección que comprende dos cámaras y un elemento puente tal como se proporciona en esta memoria. En particular, un método de este tipo puede comprender las siguientes etapas: (a) disponer un fluido seminal (por ejemplo una muestra de fluido seminal deficiente que comprende al menos 15% de oligo-, al menos 32% de asteno- y/o al menos 4% de terato-zoospermia, basado en la cantidad total de los espermatozoides en el fluido seminal) en la primera cámara del dispositivo de selección; (b) llenar la segunda cámara del dispositivo de selección con un medio para recibir espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN; y (c) conectar ambas cámaras mediante el elemento de puente de manera que se produce un puente de fluido entre la primera y la segunda cámara. Esta técnica permite que los espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN pasen de la primera a la segunda cámara. La muestra de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN obtenida es de alta calidad y se puede utilizar en diversas aplicaciones. De acuerdo con la presente invención, se encontró, en particular, que el método tal como se proporciona en esta memoria, conduce a métodos de reproducción tales como fertilizaciones *in vitro*, a una tasa sorprendentemente baja de anomalías y/o aneuploidías en la descendencia, en particular en la descendencia de padres que se caracterizan por su baja calidad del esperma. Por lo tanto, la presente invención se refiere a medios y métodos para la reducción del riesgo de anomalías congénitas o aneuploidías en tecnologías reproductivas artificiales, comprendiendo dichos medios y métodos la selección y/o el enriquecimiento de los espermatozoides de acuerdo con esta invención. En este contexto, también se describen medios y métodos para la selección y/o el enriquecimiento de espermatozoides que tienen un riesgo reducido de inducir o conducir a anomalías congénitas o aneuploidías después de y en el curso de las tecnologías de reproducción artificial tales como fertilizaciones *in vitro*.

30 Un número relativamente alto de pacientes no logra quedar embarazado a pesar de la ausencia evidente de factor masculino o femenino de la infertilidad. Es probable que muchas de estas parejas posean en realidad factor masculino genómico, incluyendo alteraciones meióticas, aneuploidía o daños del ADN de espermatozoides. La fragmentación del ADN de espermatozoides aumenta en muestras de semen de calidad deficiente y se correlaciona con la fertilización fallida, desarrollo defectuoso de pre-implantación, resultado del embarazo reducido y, en particular, tasa elevada de malformaciones de la descendencia (Zini, A., et al, 2008, "Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systemic review and meta-analysis Hum. Reprod. 23, 2663-2668).

40 En los últimos años, se han establecido varios ensayos para el análisis de la fragmentación del ADN de espermatozoides. Entre otros, marcaje de extremos mellados con dUTP mediado por TdT (TUNEL), ensayo cometa, ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA), así como el ensayo de dispersión de la cromatina espermática (SCD) son los enfoques más comúnmente utilizados en los laboratorios de fecundación *in vitro*. Estos ensayos se pueden subdividir en dos categorías, los que detectan directamente el daño del ADN (p. ej., TUNEL) y los que miden la fragmentación del ADN después de un proceso de desnaturalización más bien suave (p. ej., SCSA, SCD).

45 Se cree que muchos factores inducen una fragmentación del ADN, tales como apoptosis, radicales oxígeno, radioterapia y quimioterapia o agentes tóxicos medioambientales, etc.

El daño en el ADN del espermatozoide puede producirse durante la producción y/o el transporte de los gametos masculinos.

50 Durante la espermatogénesis los mecanismos de selección en las células de Sertoli son los responsables de la inducción de la apoptosis mediante el marcaje de espermatozoides individuales con marcadores apoptóticos que provocan la fagocitosis de estas células (Billig et al, 1 996, "Gondal cell apoptosis: hormone-regulated cell death", Hum. Reprod. Update 2, 103-117). La actividad de nucleasa endógena testicular requerida para facilitar la protaminación aumenta adicionalmente el porcentaje de espermatozoides dañados en el ADN (McPherson et al,

1993, "Chromatin structure-function alternations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatides", *Eur. J. Histochem.* 37, 109-128).

5 Se está especulando que la fragmentación de ADN post-testicular que surge durante el transporte de espermatozoides a través del epidídimo es incluso más frecuente, ya que los espermatozoides testiculares muestran un menor nivel de daños en el ADN que los del epidídimo o los eyaculados.

10 Además, se sabe que los espermatozoides inmaduros (p. ej., que muestran retenciones citoplasmáticas) producen altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, dado que los espermatozoides están altamente empaquetados en el epidídimo, es muy probable que se produzca un daño de ADN asociado con ROS (ya sea directamente o a través de la activación de las caspasas). Por término medio, se encontró que un incremento del 25% en el nivel de ROS seminal se correlacionaba con un incremento del 10% en la fragmentación del ADN.

15 Sin embargo, si los mecanismos testiculares y del epidídimo para la separación de espermatozoides genómicamente defectuosos no funcionan correctamente, un determinado porcentaje de las células germinales defectuosas terminará en la eyaculación presentando roturas de la cadena de ADN. La influencia de este tipo de problemas en el resultado reproductor sólo puede estimarse, ya que no se sabe en qué medida el ovocito puede compensar un factor paterno e incluso si un alto porcentaje de espermatozoides en el eyaculado puede tener ADN fragmentado, podría elegirse un espermatozoide no afectado para la inseminación artificial. Esta zona gris podría ser una de las razones para la discusión convencional sobre el posible efecto de roturas de la cadena de ADN de espermatozoides sobre un resultado adicional.

20 Un aspecto importante con respecto a la fragmentación de ADN de espermatozoides es la cuestión de si las roturas de la cadena de ADN son sencillas o dobles, ya que los defectos individuales son adecuadamente más fáciles de reparar en comparación con roturas del ADN de doble cadena. A este respecto debe tenerse en cuenta que el tratamiento de los espermatozoides tales como, p. ej., la centrifugación en gradiente de densidad, también podría provocar un incremento aparente de las roturas de la cadena de ADN, por lo tanto, es sumamente importante la técnica de procesamiento de espermatozoides aplicada para separar espermatozoides dañados en el ADN.

25 Se han desarrollado varios métodos para enriquecer espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN, por ejemplo: la clasificación celular magnética utilizando microperlas de anexina-V puede separar efectivamente espermatozoides apoptóticos y no apoptóticos (Said et al, 2005, "Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques ", *Reprod.*

30 *Biomed Online* 10, 740-746). Otro reducido porcentaje de espermatozoides con roturas de la cadena de ADN, ya sea la selección basada en la madurez, p. ej., según la evaluación de los sitios de unión de ácido hialurónico en la cabeza del espermatozoide (Parmegiani et al, 2010, "Physiologic ICSI: hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality, *Fertil. Steril.* 93, 598-604) o en un aumento mayor (Bartoov et al, 2003, "Pregnancy rates higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection" *Fertil. Steril.* 80, 1413-1419; Itzkan et al., 2007, "Confocal light adsorption and scattering spectroscopic microscopic monitors organelles in live cells with no exogenous labels", *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 104, 17255-17260).

35 Como característica común de todos estos métodos, éstos sólo pueden reducir el porcentaje de espermatozoides que revelan daño en el ADN, pero nunca eliminarlos de su uso posterior.

40 Así, son de importancia clínica tanto el alcance real del daño del ADN en los gametos masculinos individuales como la eficacia de determinadas técnicas de procesamiento de espermatozoides para enriquecer espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN.

45 Por lo tanto, hay una gran necesidad de un método de producción que proporcione muestras de espermatozoides que estén prácticamente exentos de roturas de la cadena de ADN, es decir, existe una necesidad de enriquecer espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN, especialmente formar muestras de semen de calidad deficiente. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de medios y métodos para disminuir las malformaciones y o anomalías de la descendencia obtenida a partir de métodos de reproducción artificial tales como fertilizaciones/inseminaciones in vitro. La muestra enriquecida de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN que puede obtenerse por los medios y métodos proporcionados en esta memoria son especialmente adecuados para su uso posterior tal como en la tecnología de reproducción artificial (es decir, IVF, inseminación) y para fines de diagnóstico.

50

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que se puede producir una muestra enriquecida de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN incluso a partir de fluido seminal de calidad deficiente. Un fluido seminal de calidad deficiente de este tipo es, por ejemplo, un fluido seminal que comprende al menos 15% de oligo-, al menos 32% de asteno- y/o al menos 4% de terato-zoospermia, basado en la cantidad total de los espermatozoides en el fluido seminal. El método descrito en esta memoria para la obtención de una muestra de fluido seminal/esperma que comprende ADN enriquecido prácticamente exento de roturas de la cadena de ADN, puede comprender las siguientes etapas

- 5
- 10
- 15
- (a) disponer un fluido seminal (por ejemplo de calidad deficiente, tal como una muestra de esperma que comprende al menos 15% de oligo-, al menos 32% de asteno- y/o al menos 4% de terato-zoospermia, basado en la cantidad total de los espermatozoides en el fluido seminal) en una primera cámara del dispositivo de selección;
 - (b) llenar una segunda cámara del dispositivo de selección con un medio para recibir espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN; y
 - (c) conectar ambas cámaras mediante un elemento de puente de tal manera que se forma un puente de fluido entre la primera y la segunda cámara que permite que los espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN pasen de la primera a la segunda cámara.

Los términos "oligo-", "asteno-" y "terato-zoospermia", también denominado "oligoastenoteratozoospermia" (OAT) se refieren en la presente invención a condición de semen que incluye, entre otros,

- 20
- > oligozoospermia, es decir, un número bajo de espermatozoides,
 - > astenozoospermia, es decir, una deficiente motilidad de los espermatozoides, y
 - > teratozoospermia, es decir, una forma anormal de los espermatozoides.

Estas propiedades de las células espermáticas pueden ser determinadas por microscopía óptica utilizando una gota de eyaculado reciente en una cámara Makler para determinar la motilidad y la concentración de la muestra de células espermáticas, mientras que la morfología se determina utilizando un frotis de esperma muerto.

25

Trastornos relacionados con la estructura de los espermatozoides o su "morfología" es una razón importante de la infertilidad. Hasta ahora, como criterio de Kruger si este tipo de trastornos estructurales son más de 4% se considera normal.

30

De acuerdo con la Norma 2010 de la OMS, un eyaculado generativo (fluido seminal) comprende al menos 15 millones de células espermáticas por mililitro, en donde al menos el 32% de estas células espermáticas son móviles progresivas. El eyaculado generativo comprende no más de 15% de oligo-, 32% de asteno- y/o 4% de terato-zoospermia, basado en la cantidad total de espermatozoides.

35

Un eyaculado (fluido seminal) no generativo (calidad deficiente) comprende menos de 15 millones de células espermáticas, en donde al menos el 32% de las células espermáticas son inmóviles y/o al menos 15% de las células espermáticas son oligozoospermia, 32% asteno-, y/o 4% terato-zoospermia, basado en la cantidad total de espermatozoides.

El término "móviles" se refiere, de acuerdo con la presente invención, a células espermáticas que son capaces de moverse dentro de un medio, tal como un líquido, por su propio movimiento.

En general, la motilidad de las células espermáticas se clasifica en cuatro categorías (véase la Norma 2010 de la OMS):

- 40
- (a) células espermáticas que muestran una motilidad progresiva rápida, es decir, estas células son más fuertes, nadan rápido en línea recta y son orientadas al objetivo. Dichas células espermáticas muestran una velocidad de al menos 25 micrómetros/s a 37 °C, y a 20 °C una velocidad de 20 micrómetros/s,
 - (b) células espermáticas que muestran una motilidad progresiva, es decir, estas células también avanzan, pero tienden a viajar en un movimiento curvo o torcido,

(c) células espermáticas que muestran una motilidad no progresiva, es decir, estas células tienen una motilidad no progresiva porque no se mueven hacia delante a pesar de que mueven las colas. La velocidad de estas células espermáticas es inferior a 5 micrómetros/s; y

(d) células espermáticas que son inmóviles, es decir, las células dejan de moverse.

5 En un eyaculado generativo que puede ser adecuado para la presente invención, al menos el 25% de células espermáticas de una muestra debería mostrar una motilidad progresiva rápida (categoría (a)) o al menos el 50% de las células espermáticas de una muestra debería mostrar una motilidad progresiva (categoría (a) + (b)). No obstante, en el método de la invención también se puede utilizar un eyaculado en el que menos de 25% de las células espermáticas de una muestra de esperma muestran una motilidad progresiva rápida o menos del 50% de las células espermáticas muestran una motilidad progresiva.
10

La motilidad de las células espermáticas también puede determinarse mediante microscopía. La motilidad de las células espermáticas se determina, por ejemplo, mediante microscopía utilizando una sola gota de eyaculado reciente en una cámara Makler. Para calcular con mayor precisión la motilidad y la velocidad de los espermatozoides, se pueden utilizar programas de ordenador tal como el CASA (Computer Assisted Sperm Analysers) para ayudar a diagnosticar determinadas infertilidades relacionadas con la motilidad masculina.
15

En el método de la invención el fluido seminal utilizado puede comprender preferiblemente menos de 80 millones de células espermáticas, menos de 50 millones de células espermáticas, menos de 20 millones de espermatozoides, menos de 15 millones de células espermáticas por mililitro. La presente invención se lleva a cabo preferiblemente con un fluido seminal que comprende 5 a menos de 80 millones de células espermáticas por mililitro.

20 Además, el fluido seminal se puede caracterizar porque el fluido comprende al menos 32%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45% de astenozoospermia, es decir, las células espermáticas muestran una motilidad deficiente o son inmóviles (véanse las categorías (c) y (d) anteriormente en esta memoria).

Además, el fluido seminal que se puede emplear como material de partida en el método de la invención puede ser de peor calidad y puede comprender al menos 15%, al menos 18%, al menos 20% de oligozoospermia, y/o al menos 4%, al menos 5%, al menos 8% teratozoospermia, basado en la cantidad total de espermatozoides.
25

El fluido seminal puede comprender 32% a 50% de asteno-, 15% a 25% de oligo- y/o 4% a 10% de teratozoospermia.

De acuerdo con la presente invención, el fluido seminal puede comprender la condición de los tres sémenes, es decir, el fluido seminal es un denominado oligoastenoteratospermia, o sólo uno o dos de ellos en cualquier combinación.
30

En la presente invención, se ha encontrado, sorprendentemente, que espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN muestran una alta motilidad en el dispositivo de selección descrito y en el método según se proporciona en esta memoria. Así, en el método de la invención, los espermatozoides de mayor calidad se seleccionan debido a su motilidad/velocidad y no debido a su morfología (p. ej., células espermáticas con vacuolas más pequeñas, deformación de la cabeza y/o gotitas citoplasmáticas pasada la barrera del medio del eyaculado).
35

Por lo tanto, el método de la invención permite el enriquecimiento de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN de un fluido seminal, en particular de semen/fluido seminal/disoluciones que comprenden células espermáticas que tienen una calidad deficiente tales como semen/fluido seminal/disoluciones que comprenden células espermáticas que comprenden una alta cantidad de células espermáticas que muestran y/o comprenden daños de ADN, en particular, roturas de la cadena de ADN/fragmentaciones de ADN.
40

De acuerdo con la presente invención, 5 a 95%, 10 a 90%, 20 a 85%, 25 a 80%, 30 a 50% de las células espermáticas en muestras de esperma de calidad deficiente muestran una fragmentación del ADN determinada mediante el ensayo de SCD según se describe en el apartado "Material y Métodos".

45 La expresión "fluido seminal" se refiere, de acuerdo con la presente invención, al eyaculado de un mamífero. Como es común, el eyaculado se obtiene por masturbación de los mamíferos después de dos a diez días de abstinencia, preferiblemente después de dos a cinco días de abstinencia. Para llevar a cabo el método de acuerdo con la presente invención, puede ser necesario que el fluido seminal contenga, además del eyaculado obtenido, un medio adecuado para los espermatozoides.

- 5 En la presente invención se puede utilizar un eyaculado de un ser humano o animal. En particular, en la ganadería o en la cría de animales es esencial que el eyaculado utilizado para la inseminación artificial tenga una alta calidad. Especies y animales ilustrativos en que los medios y métodos proporcionados en este documento son de gran ventaja son ganado, caballos, camellos, cerdos, etc. La presente descripción es en particular útil para evitar y/o reducir el riesgo de malformaciones y/o anomalías de la descendencia de mamíferos después de métodos de reproducción artificial. Por lo tanto, con el fin de asegurar que el fluido seminal utilizado sea de mayor calidad y evite o reduzca el riesgo de anomalías no deseadas, se puede utilizar el presente método.
- Se prefiere que el eyaculado/semen/fluido seminal/disoluciones que comprenden las células espermáticas utilizadas en el método de la invención se obtenga de un ser humano, es decir, un hombre.
- 10 El dispositivo de selección que se puede utilizar en el método de la invención comprende una primera y una segunda cámara, así como un elemento de puente.
- Antes de que el fluido seminal se coloque directamente en la primera cámara del dispositivo de selección, el líquido seminal no es pre-tratado, es decir, las células espermáticas no son preseleccionadas por los métodos que se utilizan comúnmente para el enriquecimiento de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN, p. ej., centrifugación en gradiente de densidad, clasificación celular magnética, etc.
- 15 Se prefiere que el fluido seminal se coloque directamente en la primera cámara del dispositivo de selección después de que haber sido obtenido y licuado del hombre o del animal. Además, se prefiere que el eyaculado/fluido seminal utilizado en el método de la invención no tenga una antigüedad superior a 90 minutos, preferiblemente superior a 60 minutos, más preferiblemente superior a 45 minutos, después de obtener el eyaculado, para el mamífero, tal como después de la eyaculación después la masturbación o la eyaculación por otros medios empleados, entre otros, en la cría de animales. Preferiblemente, el eyaculado/fluido seminal a ser tratado de acuerdo con la presente invención es de una edad de aproximadamente 1 a aproximadamente 90 minutos (período de tiempo después de que el eyaculado/fluido seminal haya abandonado el animal macho, el ser humano varón) antes de que se coloque en la primera cámara del dispositivo de selección.
- 20 Alternativamente, también es posible utilizar un fluido seminal congelado/descongelado en el método de la invención. En ese caso, de preferencia directamente después de la masturbación/eyaculación del mamífero el fluido seminal se congela para el almacenamiento y después se descongela a fin de llevar a cabo el método de la invención. Para la congelación, el almacenamiento y la descongelación se puede utilizar cualquier método que es común en la técnica. Obviamente, cuando se emplea el método de la invención se han de emplear muestras de esperma/fluido seminal, etc. que son descongeladas y en un medio correspondiente, tampón, etc.
- 25 Después se llena la primera cámara, la segunda cámara se llena con un medio adecuado conocido en la técnica.
- El término "medio" se refiere a cualquier tipo de compuesto en el que puedan moverse los espermatozoides. Medios preferidos son los medios fluidos tales como líquidos y geles. Dichos medios fluidos y geles pueden contener también sustancias adicionales tales como disoluciones de nutrientes u otras sustancias que influyen (véase pentoxifilina). Se prefiere utilizar una disolución de nutrientes como medio. Sin embargo, es evidente para la persona experta en la técnica que el método de la invención también se puede emplear directamente en muestras de fluido seminal/esperma (p. ej., no diluidas).
- 35 Después de llenar la segunda cámara con un medio, el elemento de puente se monta en las cámaras. El elemento de puente de acuerdo con la presente invención tiene una abertura en la zona de la primera cámara y una abertura en la zona de la segunda cámara y es principal o totalmente hueco por dentro, de manera que puede formarse un puente de fluido entre la primera y la segunda cámara, con lo que el fluido seminal en la primera cámara está preferiblemente también cubierto con una capa del medio utilizado.
- El método de la invención se lleva a cabo preferiblemente a 37 °C. No obstante, el método de la invención puede llevarse a cabo a una temperatura entre 19 y 37 °C.
- 40 Los espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN pueden viajar a través de dicho puente de fluido desde el fluido seminal de la primera cámara a la disolución de nutrientes de la segunda cámara. Por lo tanto, los espermatozoides no están expuestos a la carga mecánica durante la selección y las células espermáticas sin rotura de la cadena de ADN se separan de las células espermáticas que tienen un daño en el ADN.
- 45

ES 2 543 041 T3

Además, debido al puente de fluido formado se produce un campo eléctrico débil entre la primera y segunda cámara que ayuda a los espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN a viajar a través del puente de fluido y, por lo tanto, a separar los espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN de los espermatozoides que tiene un daño del ADN.

- 5 La muestra enriquecida de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN podría ser retirada de la segunda cámara, por ejemplo con una pipeta para inseminación, crioconservación o de diagnóstico para la fecundación extracorpórea. También es posible insertar uno o más cigotos directamente en la segunda cámara para la fertilización.

- 10 El fluido seminal utilizado en el método de la invención comprende 5 a 95%, 10 a 90%, 15 a 80% o 20 a 75% de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN, basado en la cantidad total de espermatozoides en el fluido seminal, y determinada mediante el ensayo de SCD según se describe en el apartado "Material y Métodos".

La muestra enriquecida de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN, producida por el método de la invención, comprende 70 a 100%, 75 a 98% u 80 a 95% de espermatozoides sin rotura de la cadena, entre otros, determinado mediante el ensayo de SCD como se describe en el apartado "Material y Métodos".

- 15 Así, el método de la invención conduce a una concentración sin rotura de la cadena de ADN muy concentrada ($P < 0,05$), ya que todos los espermatozoides seleccionados (100%) mostraron una motilidad progresiva rápida.

En la presente invención se prefiere que el dispositivo de selección utilizado consista en dos cámaras y el elemento de puente conecte ambas cámaras entre sí de tal manera que se forma un puente de fluido entre las dos cámaras.

- 20 Se prefiere además que el fluido seminal de la primera cámara y el medio de la segunda cámara estén separados por al menos una pared de las cámaras que tiene un borde superior. El elemento de puente que conecta ambas cámaras encierra este borde superior y una parte superior de dicha pared, de tal manera que en el elemento de puente se puede formar el puente de fluido.

El puente de fluido es generado preferiblemente por fuerzas capilares.

- 25 De acuerdo con la enseñanza de la invención, el elemento de puente se satura completa o parcialmente en contacto con el fluido seminal de la primera cámara y el medio de la segunda cámara.

Además, se prefiere que el elemento de puente tenga al menos un canal formado por paredes limitadoras.

Se prefiere, además, que el elemento de puente tenga al menos dos, más preferiblemente al menos tres, e incluso más preferiblemente al menos cuatro, lo más preferiblemente al menos diez canales formados por paredes limitadoras. Se prefiere que el elemento de puente tenga hasta 20 canales formados por paredes limitadoras.

- 30 También se prefiere que las paredes limitadoras y, por lo tanto, el canal o los canales del elemento de puente tengan una sección transversal en forma de U.

- 35 La longitud de cada uno de los canales del elemento de puente es preferiblemente entre 15 y 40 milímetros, más preferiblemente entre 20 y 38 milímetros, lo más preferiblemente entre 25 y 35 milímetros, medido desde la primera a la segunda cámara. Esto facilita el llenado del canal del elemento de puente y asegura que los espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN se enriquezcan en la segunda cámara de una manera óptima, pero la longitud de cada uno de los canales es demasiado corta para separar los espermatozoides debido a las características sexuales. Así, el método de la presente invención conduce específicamente a una muestra enriquecida de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN.

- 40 Se prefiere, además, que al menos un canal del elemento de puente sobresalga más en la segunda cámara que en la primera cámara.

Además, se prefiere que al menos un canal del elemento de puente sea un canal plano. Es más preferido que el elemento de puente comprenda al menos dos, incluso más preferido al menos cinco, y lo más preferido al menos diez canales planos. De acuerdo con la presente invención, el elemento de puente puede comprender hasta 20 canales planos.

La expresión "canal plano" se refiere, de acuerdo con la presente invención, a un espacio hueco que tiene una extensión más pequeña en una dimensión que en las otras dos dimensiones. Preferiblemente, la extensión del espacio hueco en las otras dos dimensiones es un múltiplo de la extensión en la primera dimensión.

5 De acuerdo con la presente invención, el canal plano ya tiene una forma definida, es decir, tiene dimensiones fijas predefinidas por la disposición fija de las paredes limitadoras. Esto significa que en el estado lleno, la conexión de las cámaras mediante el fluido seminal/medio presente en el canal se puede formar de una manera óptima después haber montado el elemento de puente en las cámaras, y el fluido seminal/medio en el canal es suficiente, es decir, no se somete a convección, de manera que los espermatozoides sin rotura del ADN se mueven a través del canal sobre la base de su motilidad. Por lo tanto, se garantiza que la selección de los espermatozoides móviles se efectúe
10 siempre de una manera rápida y reproducible.

Además, se prefiere que el dispositivo de selección utilizado esté formado de manera que la primera cámara y la segunda cámara estén al menos parcialmente interconectadas por sus paredes.

En este caso, el elemento de puente está montado en las cámaras, al menos parcialmente interconectadas, de tal manera que las paredes conectadas de las cámaras y uno de los lados del elemento de puente formen cada uno
15 una pared limitadora de un canal, preferiblemente de un canal plano.

Cuando el elemento de puente está montado en las cámaras al menos parcialmente interconectadas, las paredes limitadoras que se extienden desde la primera a la segunda cámara tienen una abertura en la zona de la primera cámara y la segunda cámara en cada caso. Los canales, así formados, se pueden rellenar con el fluido seminal/medio para generar el puente de fluido entre las dos cámaras, al menos parcialmente interconectadas, en
20 que los espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN pueden pasar de la primera a la segunda cámara. Por lo tanto, el fluido seminal en la primera cámara está conectado con el medio en la segunda cámara.

Además, se prefiere que el elemento de puente comprenda un elemento de ajuste de manera que cada uno de los canales siempre se forma de la misma manera definida cuando se monta el elemento de puente.

Preferiblemente, la distancia entre las paredes limitadoras opuestas que forman un canal, o partes de dichas paredes, está predefinida de tal manera que las fuerzas capilares actúan sobre el fluido seminal/medio con el que se llena el canal, de modo que tras el contacto con el medio el canal se satura independientemente, al menos en parte,
25 preferiblemente por completo.

Esta construcción permite que cada uno de los canales, que es preferiblemente un canal plano, se forme siempre de modo fiable de una manera predefinida, reproducible, cuando el elemento de puente se monta en la pared de conexión de las cámaras por parte del usuario, es decir, el canal tiene las dimensiones predefinidas por la
30 disposición, independientemente de la manipulación del usuario. El elemento de ajuste hace posible dar al canal formado una forma óptima para la formación del puente de fluido, independientemente de la manipulación del dispositivo por el usuario.

Más preferiblemente, el dispositivo de selección utilizado en el método de la presente invención está formado de manera que las paredes limitadoras opuestas del canal tengan una distancia de separación máxima de 1,0 milímetro, preferiblemente 0,5 milímetros, más preferiblemente 0,3 milímetros.

Más preferiblemente, las paredes limitadoras opuestas que forman un canal del elemento de puente, o partes de paredes limitadoras, tienen una distancia mínima de separación de 0,1 milímetros, preferiblemente 0,2 milímetros. De manera especialmente preferible, paredes limitadoras opuestas tienen una distancia de separación en el
40 intervalo de 0,3 a 0,4 milímetros.

Las distancias preferidas indicadas entre las paredes limitadoras garantizan una formación óptima preferiblemente de un puente de fluido de fluido seminal, medio acuoso o disolución de nutrientes en los canales a través de la acción capilar de los canales.

Se prefiere, además, que las paredes opuestas limitadoras de un canal se extienden en paralelo entre sí en el dispositivo de selección utilizado en la presente invención.
45

Preferiblemente, los canales del dispositivo están formados de modo que un par de canales comparte, al menos parcialmente, una pared limitadora, preferiblemente comparte una pared limitadora total.

Se prefiere, además, que al menos un canal del dispositivo utilizado sobresalga con una distancia diferente en la primera cámara en comparación con los otros canales. Más preferiblemente, todos los canales del dispositivo sobresalen con diferentes distancias en la primera cámara.

5 Las diferentes profundidades de inserción de los canales en la primera cámara facilitan la salida de especialmente un medio con una elevada tensión superficial de los canales a través de la formación de gotas mejorada, facilitando de esta manera el llenado de los canales. Esto se aplica, por ejemplo, al fluido nutriente para los espermatozoides, que tiene una tensión superficial considerablemente mayor en comparación con el agua.

10 Preferiblemente, la primera cámara del dispositivo de selección utilizado tiene forma anular y encierra la segunda cámara. Más preferiblemente, el elemento de puente del dispositivo utilizado está en una disposición rotacionalmente simétrica.

También se prefiere que las dos cámaras del dispositivo utilizado sean parte de un elemento de cámara hecho de una sola pieza.

El dispositivo utilizado se puede construir de materiales tales como vidrio o plástico. Se prefiere que el dispositivo de selección esté hecho de polietileno.

15 En el método de acuerdo con la presente invención se prefiere utilizar un dispositivo de selección tal como se describe en el documento EP 1 432 787 (o WO 94/17742 o WO 03/031564). El contenido de la divulgación del documento EP 1 432 787, así como de los documentos WO 94/1 7742 y WO 03/031564.

20 El método de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente en un período de tiempo de 20 a 120 minutos, más preferiblemente de 25 a 100 minutos, incluso más preferiblemente de 30 a 60 minutos, lo más preferiblemente de 30 a 40 minutos. Este período asegura que los espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN estén completamente separados de los espermatozoides con fragmentación del ADN.

Preferiblemente, los métodos descritos en esta memoria se llevan a cabo en condiciones estériles.

Se prefiere, además, que el fluido seminal se utilice en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 mililitros, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mililitros en el método de la invención.

25 Se prefiere, además, que si el dispositivo de selección según se describe arriba está hecho de polietileno, el volumen mínimo utilizado del fluido seminal es de aproximadamente 1 mililitro, y si el dispositivo de selección está hecho de vidrio, el volumen mínimo utilizado del fluido seminal es de aproximadamente 2 mililitros.

30 Si el volumen de eyaculado es menor que la requerida arriba, y con el fin de obtener el volumen requerido, la diferencia puede ser completada con un medio adecuado de disolución tampón tal como con medio BM1, u otro medio que sea permisible y/o útil para la preparación del semen, con el fin de obtener el volumen requerido.

La descripción también se refiere a medios y métodos para la reducción del riesgo de una anomalía congénita o aneuploidía en una tecnología de reproducción artificial que comprende la selección y/o el enriquecimiento de espermatozoides y para la selección y/o enriquecimiento de los espermatozoides que tienen un riesgo reducido de inducir o conducir a una anomalía congénita o aneuploidía después de la fecundación in vitro.

35 También se describe el uso de un dispositivo para la selección de espermatozoides de un fluido seminal (o también de espermatozoides proporcionados en otras disoluciones tales como tampones, etc.) para reducir el riesgo de una anomalía congénita o aneuploidía en una tecnología de reproducción artificial. Dispositivos adecuados para la selección de espermatozoides se describen en el documento WO-A1 94/17742 o WO-A2 03/031564. En particular, se describe el uso de un dispositivo para la selección de espermatozoides de un fluido seminal para reducir el riesgo
40 de una anomalía congénita o aneuploidía en una tecnología de reproducción artificial, en el que el dispositivo comprende una primera cámara (1) para recibir un medio de fluido seminal (12b, 13) que contiene los espermatozoides a ser seleccionados y, separada de ella, una segunda cámara (2) para recibir los espermatozoides seleccionados en un medio adicional (12a), caracterizado por que comprende un elemento de puente (3) que puede estar montado sobre las cámaras (1, 2) que tiene al menos un conducto plano (6a-d) formado por paredes de
45 contorno (4a-e) que, cuando se monta el elemento de puente (3), se extiende desde la primera cámara (1) a la segunda cámara (2), tiene en cada caso una abertura en la región de la primera cámara (8a-d) y la segunda cámara (10a-d) y se puede llenar con un medio en el que los espermatozoides se pueden mover de manera que el medio en la primera cámara (12b, 13) está conectado al de la segunda cámara (12a). Un dispositivo ilustrativo a emplear de

acuerdo con la presente invención también se muestra en las figuras adjuntas tales como, p. ej., la figura 2 y la figura 3.

También se describe el uso de un dispositivo de este tipo para la selección de espermatozoides que tienen un riesgo reducido de inducir o conducir a una anomalía congénita o aneuploidía para una tecnología reproductiva artificial. En particular, el dispositivo comprende una primera cámara (1) para recibir un medio (12b, 13) que contiene los espermatozoides a seleccionar y, separada de ella, una segunda cámara (2) para recibir los espermatozoides seleccionados en un medio adicional (12a), caracterizado por que comprende un elemento de puente (3) que puede ser montado sobre las cámaras (1, 2) que tiene al menos un conducto plano (6a-d) formado por paredes de contorno (4a-e) que, cuando el elemento de puente (3) está montado, se extiende desde la primera cámara (1) a la segunda cámara (2), tienen en cada caso una abertura en la región de la primera cámara (8a-d) y la segunda cámara (10a-d) y puede ser llenado con un medio en el que los espermatozoides se puede mover de tal manera que el medio en la primera cámara (12b, 13) está conectado al de la segunda cámara (12a).

Correspondientes dispositivos adecuados también se ilustran en las Figs. 2 y 3 adjuntas.

En una forma de realización preferida del dispositivo, las paredes de la primera cámara (1) y la segunda cámara (2) están conectadas (5), al menos en parte, entre sí y el elemento de puente (3) se puede montar en las cámaras (1, 2) de tal manera que las paredes conectadas (5) y un lado del elemento de puente (4e) forman en cada caso una pared límite de un conducto plano (7) que tiene una abertura en cada caso en la región de la primera cámara (9) y la segunda cámara (11) y puede ser llenado con un medio en el que los espermatozoides se pueden mover de tal manera que el medio en la primera cámara (12b, 13) está conectado al de la segunda cámara (12a). En este contexto se prefiere que al menos un elemento de ajuste (14) esté provisto de tal manera que el conducto (7) formado por las paredes de las cámaras conectadas (5) y un lado del elemento de puente (4e) como paredes limitrofes esté siempre formada de la misma manera definida cuando está montado el elemento de puente (3).

Se prefiere además que la distancia entre las paredes limitrofes opuestas (4a-e, 5) o partes de las paredes limitrofes (4a-e, 5) que forman un conducto, esté predefinida de tal manera que las fuerzas capilares actúan sobre el medio con el que el conducto es llenado, con el resultado de que el conducto automáticamente empapa total o parcialmente por sí mismo al entrar en contacto con el medio.

En una realización particular, la distancia máxima entre las paredes limitrofes opuestas (4a-e, 5) o partes de paredes limitrofes (4a-e, 5) que forman un conducto (6a-d, 7) es como máximo 1,0 mm, preferiblemente 0,5 mm, y la distancia mínima es al menos 0,1 mm, preferiblemente 0,2 mm.

Las paredes limitrofes opuestas (4a-e, 5) de un conducto (6ad, 7) puede discurrir preferiblemente en cada caso paralelas entre sí. Se prefiere que dos conductos (6a-d, 7) tengan cada uno, al menos parcialmente, una pared limitrofe común (4b-e). Las paredes limitrofes (4a-e, 5) de los conductos (6a-d, 7) tienen preferiblemente una sección transversal en forma de U. En una realización particular, una de las cámaras (1, 2) está desarrollada de forma anular (1) y encierra a la otra cámara (2).

Sorprendentemente, se encontró de acuerdo con la presente invención que el método descrito en esta memoria para la producción de una muestra enriquecida de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN conduce a una cantidad sorprendentemente alta de espermatozoides para, p. ej., la fertilización in vitro. Sorprendentemente, este método proporciona y conduce a la selección y/o el enriquecimiento de espermatozoides que tienen un riesgo reducido de inducir y/o conducir a una anomalía congénita o aneuploidía después de la fertilización in vitro. Por consiguiente, la presente descripción se refiere a la reducción del riesgo de anomalía congénita o aneuploidía en una tecnología de reproducción artificial que comprende la selección y/o enriquecimiento de espermatozoides y para la selección y/o el enriquecimiento de espermatozoides que tienen un riesgo reducido de inducir o conducir a una anomalía congénita o aneuploidía después de la fertilización in vitro.

La descripción se refiere, además, a un método para reducir el riesgo de una anomalía congénita o aneuploidía en una tecnología de reproducción artificial que comprende la selección y/o el enriquecimiento de espermatozoides, comprendiendo el método las etapas de

- (a) disponer un fluido seminal que comprende los espermatozoides en una primera cámara de un dispositivo de selección;
- (b) llenar una segunda cámara del dispositivo de selección con un medio para recibir los espermatozoides seleccionados; y

- (c) conectar ambas cámaras mediante un elemento de puente de tal manera que se forma un puente de fluido entre la primera y la segunda cámara que permite que los espermatozoides pasen de la primera a la segunda cámara.

5 Además, la invención se refiere a un método para la selección y/o el enriquecimiento de espermatozoides que tienen un riesgo reducido de inducir o conducir a una anomalía congénita o aneuploidía después de la fertilización in vitro, comprendiendo el método las etapas de

- (a) disponer un fluido seminal que comprende los espermatozoides en una primera cámara de un dispositivo de selección;
- 10 (b) llenar una segunda cámara del dispositivo de selección con un medio para recibir los espermatozoides seleccionados; y
- (c) conectar ambas cámaras mediante un elemento de puente de tal manera que se forma un puente de fluido entre la primera y la segunda cámara que permite que los espermatozoides pasen de la primera a la segunda cámara.

15 Estos métodos se llevan a cabo preferiblemente utilizando los dispositivos arriba descritos para la selección de espermatozoides.

En los medios y métodos descritos en esta memoria para la reducción del riesgo de anomalía congénita o aneuploidía en una tecnología de reproducción artificial tal como la fertilización in vitro, y en los medios y métodos para la selección y/o el enriquecimiento de los espermatozoides que tienen un riesgo reducido de inducir o que conducen a anomalías de este tipo o a daños cromosómicos indeseados, las realizaciones descritas arriba en esta memoria en el contexto de la producción de una o más muestras enriquecidas de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN se aplican aquí mutatis mutandis.

20

En particular, estos métodos también se caracterizan por que el fluido seminal de la primera cámara y el medio de la segunda cámara están separados por al menos una pared de las cámaras que tienen un borde superior y en donde el elemento de puente que conecta ambas cámaras encierra el borde superior y una parte superior de dicha pared.

25 Además, el puente de fluido entre las dos cámaras puede ser generado por fuerzas capilares, de modo que el elemento de puente se satura mediante un contacto completo o parcial con el fluido seminal de la primera cámara y el medio de la segunda cámara. Dicho elemento de puente puede tener al menos un canal formado por paredes limitadoras que se extienden desde la primera cámara a la segunda cámara del dispositivo de selección, con lo que dichas paredes limitadoras del canal puede tener, en una realización, una sección transversal en forma de U. Como se ha señalado anteriormente en esta memoria, dicho al menos un canal del elemento de puente puede tener una longitud de 15 a 40 milímetros, medido desde la primera a la segunda cámara y dicho al menos un canal del elemento de puente puede sobresalir más lejos en la segunda cámara que en la primera cámara. Además, dicho al menos un canal del elemento de puente puede ser un canal plano formado por paredes limitadoras. En una alternativa, los medios y métodos proporcionados en esta memoria pueden caracterizarse por que

30

- 35 (a) las paredes de la primera y segunda cámara están al menos parcialmente interconectadas;
- (b) el elemento de puente está montado en las cámaras de tal manera que las paredes conectadas de las cámaras y uno de los lados del elemento de puente forman en cada caso una pared limitadora del canal; y
- (c) está previsto al menos un elemento de ajuste de tal manera que el canal siempre se forma de la misma manera definida cuando se monta el elemento de puente.

40 La distancia entre las paredes limitadoras opuestas que forman un canal, o partes de dichas paredes limitadoras, pueden ser predefinidos de tal manera que las fuerzas capilares actúan sobre el medio con el cual se llena el canal, de modo que el canal independientemente se vuelve saturado por completo o en parte por el contacto con el medio. La o las primeras cámaras pueden ser de forma anular y pueden encerrar la segunda cámara.

45 Tal como se discute en esta memoria y como se ilustra en el ejemplo adjunto, la presente descripción proporciona medios y métodos para la selección de espermatozoides a partir de (a) fluido o fluidos seminales, en particular para reducir el riesgo de anomalía congénita o de aneuploidía. Los medios y los métodos tal como se proporcionan en

esta memoria se pueden efectuar de manera que la muestra enriquecida de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN producida/obtenida comprende 70 a 100% de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN basada en la cantidad total de los espermatozoides en la muestra y según se determina, entre otros, de acuerdo con el ensayo de SCD. A modo de referencia a un ejemplo, se podría demostrar de acuerdo con la presente invención que en una muestra de fluido seminal humana que comprendía aproximadamente 80% de ADN fragmentado/ADN que comprende roturas de la cadena después de la eyaculación, la cantidad de ADN fragmentado/ADN que comprende roturas de la cadena se puede reducir a aproximadamente 2% empleando los métodos descritos en esta memoria. Un enriquecimiento de ADN sin roturas de la cadena no se podía obtener por métodos conocidos en la técnica. Los métodos de la presente invención, es decir, la selección de espermatozoides de alta calidad sin o con considerablemente menos roturas de la cadena de ADN procedente de fluido seminal y el enriquecimiento de muestras de espermatozoides libres de rotura de la cadena de ADN y los correspondientes métodos para la reducción del riesgo de anomalías congénitas o aneuploidías en tecnologías de reproducción artificiales, puede llevarse a cabo en cortos períodos de tiempo, p. ej., en un período de tiempo de aproximadamente 20 a aproximadamente 120 minutos.

En el contexto de los usos, medios y métodos arriba descritos, la tecnología de reproducción artificial es preferiblemente la fertilización in vitro (FIV) y/o la inseminación. En una realización, dicha fertilización in vitro se ha de llevar a cabo en pacientes humanos.

Los medios y métodos proporcionados en esta memoria no se limitan a pacientes humanos, sino que se pueden adaptar fácilmente por la persona experta en la técnica a otros sujetos y ganado, en particular de otros mamíferos tales como reses, caballos, cerdos, camellos, etc.

Anomalías congénitas relevantes que pueden reducirse con éxito mediante el empleo de los medios y métodos de la presente invención incluyen anomalía de las extremidades (dismelia), anomalía congénita del corazón, anomalía congénita del sistema nervioso y anomalía congénita del sistema gastrointestinal.

Las anomalías congénitas de las extremidades son, por ejemplo, amelia, ectrodactilia, focomelia, polimelia, polidactilia, sindactilia, polisindactilia, oligodactilia, braquidactilia, acondroplasia, aplasia o hipoplasia congénita, síndrome de banda amniótica y disostosis cleidocraneal. Anomalías congénitas del corazón son, por ejemplo, conducto arterioso patente, defecto atrial septal, defecto ventricular septal y tetralogía de Fallot. Anomalías congénitas del sistema nervioso son, por ejemplo, defectos del tubo neural tal como la espina bífida, meningocele, meningomielocelo, encefalocele, anencefalia, malformación de Arnold-Chiari, malformación de Dandy-Walker, hidrocefalia, microencefalia, megaencefalia, lisencefalia, polimicrogiria, holoprosencefalia y agenesia del cuerpo caloso. Anomalías congénitas del sistema gastrointestinal son, por ejemplo, estenosis, atresia e imperforado.

Debido a la facilidad de manipulación del método descrito, no es necesario que el método de la invención se lleve a cabo por el personal de laboratorio, el método puede llevarse a cabo por cualquier persona.

Además, en la presente invención se demuestra que el uso de un dispositivo de selección tal como se describe arriba conduce a una muestra enriquecida de espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN obtenidos de un fluido seminal que muestra una calidad deficiente.

La presente invención se refiere también a las siguientes figuras y ejemplos no limitativos.

Figura 1: Sección transversal esquemática del dispositivo de selección utilizado en la presente invención indicando el eyaculado en la primera cámara y medio en la segunda cámara (líneas onduladas). No se muestra la cubierta de vidrio.

a. Un dispositivo de selección que consiste en las dos cámaras (de vidrio o de polietileno) y un elemento de puente (parte superior izquierda).

b. Después del llenado de las cámaras se inserta el elemento de puente y crea un puente de fluido que permite que los espermatozoides móviles nadan a la segunda cámara (trayectoria teórica de la migración indicada por la flecha).

Figura 2: Muestra una sección transversal de un dispositivo ilustrativo en la condición desfragmentada a emplear en los métodos de la presente invención.

La **Figura 3** muestra una vista isométrica en corte parcial del dispositivo de acuerdo con la invención, así como un recipiente del mismo.

Ejemplo I: Producción de espermatozoides enriquecidos sin rotura de la cadena de ADN enriquecido cadena de ADN y selección de la cadena de ADN sin rotura a partir de fluido seminal

Material y Métodos

5 Durante el período de estudio se reclutaron 37 pacientes con sub-fertilidad masculina conocida quienes se presentaron en el laboratorio de andrología de los autores de la invención para un segundo análisis de su eyaculado. La edad media de los hombres era de $37,7 \pm 6,5$ años. Se recomendó un tiempo de abstinencia de 3-5 días. Todos los eyaculados fueron procesados y analizados estrictamente de acuerdo con el manual de la OMS (1999).

10 La mitad de los hombres padecía teratozoospermia aislada (51%). Un porcentaje más pequeño tenía astheno- (8%) u oligo-zoospermia (8%) aislada. Sin embargo, el 33% restante de los pacientes mostró una caída en más de un parámetro del espermatozoides, incluyendo 5 casos de oligoastenoteratospermia (OAT) determinados por microscopía óptica.

Tras el control de la licuefacción, el eyaculado fue procesado de inmediato a fin de evitar un contacto excesivo entre el plasma seminal y espermatozoides que podrían haber alterado el empaquetamiento de la cromatina, posiblemente interfiriendo así con la tinción de ADN.

15 Se realizaron tres análisis de fragmentación del ADN por paciente.

Muestra 1

Después de la masturbación, se conservó un volumen pequeño (aprox. 25 μ l) de semen bruto con el fin de tener un valor de referencia (muestra 1). El resto del eyaculado se dividió en dos partes desiguales con el fin de tratarlas de forma diferente.

20 **Muestra 2**

El primer volumen (1-2 ml) se procesó utilizando la técnica de centrifugación en gradiente de densidad rutinaria (muestra 2).

25 En detalle, el semen se colocó en la parte superior de dos capas (40% y 80%) de Gradiente GM501 (Gynemed, Lensahn, Alemania). Después de la estratificación, la muestra se centrifugó a 2000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Subsiguientemente, se retiraron cuidadosamente las dos capas que contenían sílice coloidal revestida con silano y el sedimento se resuspendió en medio BM 1 (NMS Bio-Medical, Praroman, Suiza). Con el fin de reducir la manipulación adicional de los espermatozoides sólo se realizó una etapa de centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra de espermatozoides purificado se incubó a 37 °C y se dejó que nadara durante aproximadamente media hora hasta realizar la medición de la rotura de la cadena.

30 **Muestra 3**

En paralelo, la primera cámara del dispositivo de selección de espermatozoides (Selector Zech, AssTIC Medizintechnik GmbH, Leutasch, Austria, documento EP 1 432 787) hecho de vidrio o polietileno se llenó con 1-3 ml de eyaculado (muestra 3).

35 Estas cámaras acumulan un número adecuado de espermatozoides móviles sin la exposición al estrés de la centrifugación. El método se llevó a cabo a 37 °C.

Después de una hora se recogió una muestra de espermatozoides de 25 μ l de la segunda cámara y se refirió a su posterior análisis.

40 Los pacientes cuyos eyaculados tuvieron que ser procesados durante más de una hora (p. ej., debido a la licuefacción retardada) fueron excluidos del estudio por el bien de la homogeneidad del grupo de estudio. Por lo tanto, se pudo garantizar que se analizaron las tres muestras (semen puro, gradiente de densidad y cámara de selección de espermatozoides) en el espacio de una hora (incluyendo el tiempo para la licuefacción), en otras palabras, se evitó el contacto prolongado con plasma seminal.

Si el volumen de eyaculado era grande (> 5 ml) se utilizaron los dos tipos de cámaras (de vidrio y polietileno) dando cuatro valores en estos pacientes.

En el estudio se aseguró que se utilizara un volumen mínimo de 2 ml para la cámara de polietileno y al menos 3 ml se cargaron en la cámara de vidrio. Si el volumen era menor que el requerido, la diferencia se completó con medio BM 1.

Ensayo de SCD

Un ensayo de SCD mejorado, el llamado ensayo Halosperm® (Halotech DNA SL, Tres Cantos, España), se ha utilizado para la determinación del porcentaje real de espermatozoides con daño en el ADN. Aunque el ensayo de SCD se ha explicado en detalle en otra parte (Fernández et al, 2003, "The sperm chromatin dispersion test: simple method for determination of sperm DNA fragmentation", J. Androl 24, 59 a 66) se debe dar aquí un breve resumen.

Todas las 3 muestras por paciente fueron tratadas por igual. Por lo tanto, un volumen de 25 µl de suspensión de eyaculado o esperma se mezcló con agarosa líquida (50 µl). Esta mezcla se pipeteó sobre portaobjetos pre-revestidos y se cubrió con pequeñas cubreobjetos. Los portaobjetos se colocaron en un refrigerador (4 °C) durante 5 minutos para permitir que la agarosa produjera un microgel con las células espermáticas incrustadas en él. Después de la gelificación los cubreobjetos se separaron suavemente y los portaobjetos se sumergieron inmediatamente en una disolución de ácido (7 minutos). Luego, los portaobjetos se sumergieron en 10 ml de una disolución de lisis (25 minutos), ya que la prueba indirecta de roturas de cadena requiere la desnaturalización del ADN. Después de una etapa de lavado de 5 minutos en agua destilada las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70% -90% -100%) durante 2 minutos en cada caso, se secaron al aire, y se almacenaron a temperatura ambiente. Para la microscopía óptica, se tiñeron los portaobjetos. Por último, pero no menos importante, los portaobjetos se lavaron brevemente en agua destilada y se dejaron secar. Se prefirió una fuerte tinción para visualizar fácilmente la periferia de los halos de ADN dispersados.

Si es posible, se puntuó un mínimo de 500 espermatozoides por muestra bajo un objetivo de 100 aumentos del microscopio óptico. Solamente se han reseñado que no tienen roturas en la cadena cabezas de espermatozoides con un halo distinto. Es importante señalar que los espermatozoides con un halo más bien pequeño tienen que ser agrupados con espermatozoides con halo negativo (presunto daño del ADN). Se encontró un valor de corte de 18% por encima del cual se espera un resultado adicional de impacto severo.

Resultados

Un total de 37 hombres considerados para participar en esta evaluación prospectiva que se ocupa de la eficiencia del Selector Zech con respecto a la reducción de espermatozoides dañados en el ADN dentro de un eyaculado dado.

El tiempo de abstinencia varió de 2 a 8 días (aunque se recomendaron 3-5 días). Este período no estaba relacionado con los principales parámetros del esperma ni con el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado. Se produjo una media de 4,4 (± 1,6) ml de eyaculado. La concentración media de espermatozoides era $76,5 \pm 103,8 \cdot 10^6/\text{ml}$ y el porcentaje correspondiente de espermatozoides móviles progresivos (WHO (a) y (b) se encontró que era $36,6 \pm 19,4\%$. El factor más afectado fue morfología de los espermatozoides con sólo el $7,8 \pm 6,9\%$ de espermatozoides normalmente formados por término medio.

El procesamiento del esperma utilizando el gradiente de densidad (Muestra 2) separó completamente los espermatozoides inmóviles y casi separó los espermatozoides WHO (c) (aprox. 1-2%). Sin embargo, no se seleccionaron los espermatozoides morfológicamente normales ($P > 0,05$).

El selector Zech (Muestra 3) se comportó significativamente mejor en la concentración de espermatozoides WHO (a) ($P < 0,05$), ya que todos los espermatozoides seleccionados (100%) mostraron una motilidad progresiva rápida. No se observó dicha mejora en términos de morfología de los espermatozoides ($P > 0,05$).

Parte de los eyaculados de 37 hombres se transfirió a la cámara de vidrio ($n = 19$) o al dispositivo de polietileno ($n = 23$). Debido a un mayor volumen, 5 eyaculados fueron procesados con ambos tipos de cámaras. Dado que el llenado del selector de polietileno no tuvo éxito en dos casos (8,7%), 35 pacientes finalmente se pudieron incluir en el presente estudio.

Se encontró que el porcentaje de espermatozoides rotura de la cadena-positivos en el semen era $15,8 \pm 7,8\%$ (intervalo: 5,0-42,1%).

El tratamiento con gradiente de densidad redujo de forma marginal ($14,2 \pm 7,0\%$) el porcentaje de espermatozoides rotura de la cadena-positivos (intervalo: 2,0 a 30,9%).

- 5 El procesamiento del eyaculado con el selector Zech de vidrio, sin embargo, eliminó por completo los espermatozoides rotura de la cadena-positivos en 17 de 19 casos (89,5%). Dos eyaculados mostraron un porcentaje menor de espermatozoides afectados después del procesamiento ($< 2,5\%$). En general, el valor medio de daño del ADN después del procesamiento con el dispositivo de vidrio fue de $0,4\% \pm 1,1\%$ (intervalo 0 a 2,5%) y difirió significativamente del gradiente de densidad ($P < 0,001$) y el semen bruto ($P < 0,001$).
- 10 Utilizando selectores Zech de polietileno en 16 de 21 casos (76,2%) no se hizo un recuento de espermatozoides individuales con roturas de la cadena después de la selección de espermatozoides. El dispositivo de polietileno ($0,5 \pm 0,9\%$; intervalo: 0 a 3,0%) era significativamente mejor en términos de reducción de la rotura de la cadena en comparación con gradiente de densidad ($P < 0,001$).
- 15 No había una diferencia de este tipo entre cámaras de vidrio y plástico ($P = 0,64$). Todos los 5 pacientes a quienes se proceso su eyaculado con los dos tipos de selectores Zech no mostraron espermatozoides rotura de la cadena-positivos después del procesamiento.

Por lo tanto, se pudo demostrar que el método de la invención conduce a una muestra de espermatozoides sin daño del ADN en contraposición con otros métodos de selección de la técnica anterior conocidos. Por lo tanto, el método de la invención proporciona una muestra de esperma de buena calidad sin manipulación adicional, p. ej., centrifugación y, por lo tanto, es muy probable que no se producirán roturas de la cadena suplementarias (artefactales).

20

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una muestra enriquecida de espermatozoides sin roturas de la cadena de ADN, que comprende las siguientes etapas
- 5 (a) disponer un fluido seminal que comprende al menos 15% de oligo-, al menos 32% de asteno- y/o al menos 4% de terato-zoospermia, basado en la cantidad total de los espermatozoides en el fluido seminal en una primera cámara de un dispositivo de selección;
- (b) llenar una segunda cámara del dispositivo de selección con un medio para recibir espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN; y
- 10 (c) conectar ambas cámaras mediante un elemento de puente de tal manera que se forma un puente de fluido entre la primera y la segunda cámara que permite que los espermatozoides sin rotura de la cadena de ADN pasen de la primera a la segunda cámara.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el fluido seminal comprende 5 a 95% de espermatozoides con rotura de la cadena de ADN, basado en la cantidad total de espermatozoides en el fluido seminal y determinado mediante el ensayo de SCD.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que el fluido seminal de la primera cámara y el medio de la segunda cámara están separados por al menos una pared de las cámaras que tiene un borde superior, y en el que el elemento de puente que conecta ambas cámaras encierra el borde superior y una parte superior de dicha pared.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el puente de fluido entre las dos cámaras se genera mediante fuerzas capilares, de modo que el elemento de puente queda completamente saturado o se produce un contacto parcial con el fluido seminal de la primera cámara y el medio de la segunda cámara.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el elemento de puente tiene al menos un canal formado por paredes limitadoras que se extienden desde la primera cámara a la segunda cámara del dispositivo de selección.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la distancia entre las paredes limitadoras opuestas que forman un canal, o partes de dichas paredes limitadoras, se pre-definen de modo que las fuerzas capilares actúan sobre el medio con el que se llena el canal, de modo que el canal queda completamente saturado de manera independiente o se produce un contacto parcial con el medio.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la primera cámara es de forma anular y encierra a la segunda cámara.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el método se lleva a cabo en un período de tiempo de 20 a 120 minutos.

Figura 1:

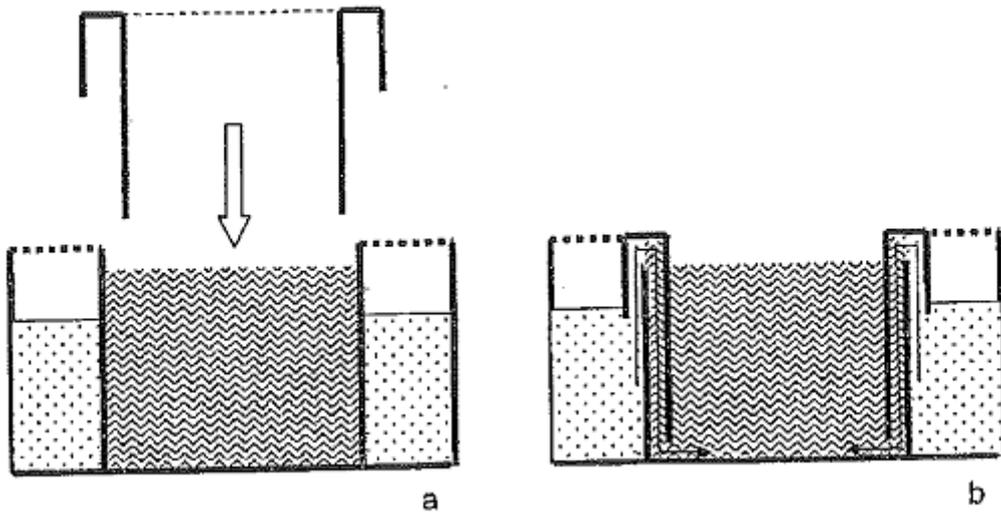


Figura 2:

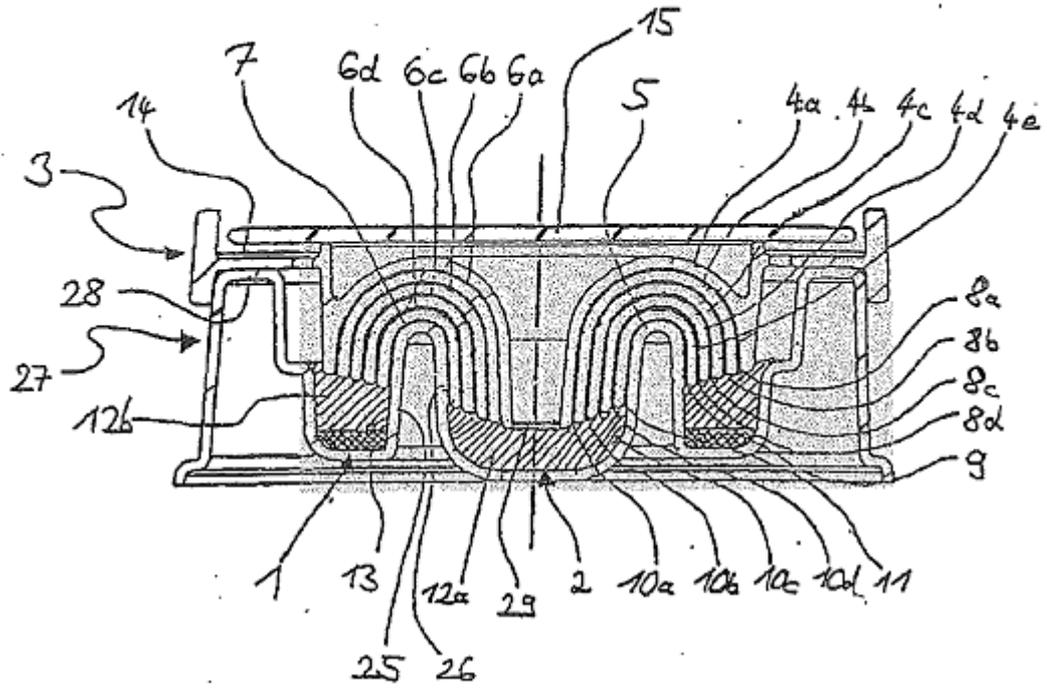


Figura 3:

