

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 011**

21 Número de solicitud: 201830324

51 Int. Cl.:

G01N 33/483 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 15/12 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61D 19/00 (2006.01)
A61D 19/02 (2006.01)
A61B 17/43 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.03.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.10.2019

71 Solicitantes:

GUTIÉRREZ SANZ, Oscar (50.0%)
Calle Miguel de Unamuno
47008 Valladolid ES y
MARTÍNEZ DOMÍNGUEZ, Carmen (50.0%)

72 Inventor/es:

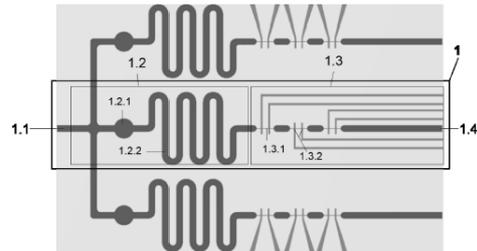
GUTIÉRREZ SANZ, Oscar y
MARTÍNEZ DOMÍNGUEZ, Carmen

54 Título: **APARATO PARA ANALIZAR DE MANERA COMPARATIVA LA MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE UNA MUESTRA DE ESPERMA**

57 Resumen:

En la actualidad, un número creciente de parejas tienen problemas para concebir. Una de las principales causas de este problema es la baja calidad del esperma. Actualmente, la calidad del esperma se analiza principalmente por profesionales en laboratorios clínicos. Recientemente, han aparecido en el mercado dispositivos o kits que permiten analizar la calidad del esperma sin acudir a estos laboratorios clínicos. Sin embargo, en la actualidad, estos kits no contemplan la capacidad de activación de los espermatozoides presentes en la muestra como un factor determinante de la calidad del esperma. El objeto de la presente invención es un aparato para analizar de manera comparativa la movilidad de los espermatozoides de una muestra de esperma mediante su exposición a diferentes compuestos estimulantes y/o depresores.

Figura 1



ES 2 726 011 A1

DESCRIPCIÓN

**APARATO PARA ANALIZAR DE MANERA COMPARATIVA LA MOVILIDAD DE
LOS ESPERMATOZOIDES DE UNA MUESTRA DE ESPERMA**

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

Esta invención se encuadra en el campo de las pruebas de fertilidad masculina, más específicamente pruebas para la determinación de la calidad de una muestra de semen.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la actualidad, un número creciente de parejas tienen problemas para concebir. Una de las principales causas de este problema es la baja calidad del esperma. Para determinar si la calidad de éste es el problema de fertilidad de una pareja, se ha de realizar un estudio del esperma.

Actualmente, el esperma se analiza principalmente por profesionales en laboratorios clínicos y el análisis puede requerir varias pruebas, dependiendo del laboratorio. Aunque exista una variación en el tipo de pruebas que se realizan, existen tres parámetros que son comunes a cualquier estudio de muestra espermática:

- Conteo de espermatozoides (número de células espermáticas por volumen de muestra)
- 25 - Tamaño de los espermatozoides
- Movilidad de los espermatozoides

Recientemente, han aparecido en el mercado dispositivos o kits que permiten determinar el número de espermatozoides sin acudir a estos laboratorios clínicos (WO97/40386, WO95/29188, EP-A-0387873). El problema que presentan este tipo de análisis es que no proporcionan la información suficiente para determinar si la calidad del esperma es suficiente para la concepción, ya que no determinan la movilidad de los espermatozoides presentes en las muestras.

35 En la literatura se pueden encontrar diferentes métodos para contabilizar y analizar

diferentes características de los espermatozoides. En la patente US4601578A se expone la muestra a un haz de luz y, con la ayuda de un fotorreceptor, es posible determinar la movilidad de los espermatozoides. En la patente CN101726578A se describe un sensor que contiene electrodos que permiten detectar los espermatozoides
5 y en el que, mediante el procesamiento de las señales obtenidas a través de medidas de impedancia, determinan la velocidad de los espermatozoides presentes en la muestra. Otros dispositivos permiten separar los espermatozoides móviles de una muestra dada (ES2234809T3, US 5.866.354, FR-A-2539628, US 5.908.380). Sin embargo, los ejemplos mencionados anteriormente no contemplan la capacidad de
10 activación de los espermatozoides presentes en la muestra como un factor determinante de la calidad del esperma.

El objeto de la presente invención es brindar una plataforma que permita determinar el número de espermatozoides en una muestra de semen, analizar su movilidad, tamaño,
15 forma y respuesta a la exposición frente a compuestos estimulantes y/o depresores de forma simultánea. De esta manera, en un mismo aparato se pueden analizar en profundidad muestras de semen de una manera sencilla.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

20

El aparato para analizar de manera comparativa la calidad de esperma objeto de la invención permite realizar un análisis cuantitativo y simultáneo de (i) la cantidad de espermatozoides, (ii) su tamaño, (iii) su movilidad y (iv) su respuesta a la exposición
frente a compuestos estimulantes y/o depresores.

25

Las ventajas principales de esta invención se resumen como sigue:

- El presente aparato permite hacer un análisis comparativo del comportamiento de los espermatozoides bajo distintos tratamientos, estimulantes y/o depresores, y sin
30 tratamiento.

- Este aparato permite que este análisis se realice en un único aparato y de forma simultánea.

El aparato para analizar de manera comparativa la calidad de esperma comprende
35 cuatro partes fundamentales (Figura 1): un orificio de entrada, un conjunto de canales

de microfluídica, los elementos necesarios para el sistema de lectura y uno o varios orificios de salida. A continuación, detallaremos estos elementos:

5 **a)** Un orificio de entrada (Figura 1 (1.1)) por el que se introduce la muestra de esperma en el conjunto de canales.

b) El conjunto de canales por el que fluye la muestra de espermatozoides. Este sistema de canales puede ser dividido en dos o más segmentos de ensayo (Figura 1 (1)). Cada segmento de ensayo se divide a su vez en dos segmentos. El primero, al que llamaremos segmento de exposición (Figura 1 (1.2)), consiste en un canal en el que la muestra puede entrar en contacto con un compuesto químico que se disolverá en la muestra y actuará como estimulador (por ejemplo, cafeína), depresor (por ejemplo, nonoxinol 9) y/o reportador (por ejemplo, un anticuerpo específico que se une a espermatozoides acoplado a un fluoróforo, de tal forma que ayuda a su detección). El segundo segmento, al que llamaremos segmento sensor (Figura 1 (1.3)), consiste en una o varias modificaciones (Figura 1 (1.3.1)) de los canales por los que fluye la muestra, cuya función es ayudar a reportar el pase de un espermatozoide a través de esta/s. En una realización preferente estas modificaciones consistirán en un estrechamiento del canal, de tal forma que las dimensiones del estrechamiento impidan el paso de varios espermatozoides al mismo tiempo. Las modificaciones pueden ser bien uno o varios estrechamientos intercalados en las dimensiones del canal del segmento de exposición donde se dispongan uno o varios elementos para el sistema de lectura o detección.

10
15
20

El dispositivo contará con tantos segmentos de ensayo como diferentes tratamientos se quieran comparar más uno control en el que los espermatozoides no se traten con compuestos que afecten a su movilidad.

25

c) Elementos para el sistema de lectura o detección. En una realización preferente el sistema de lectura es electrónico. En este caso pares de electrodos (Figura 1 (1.3.2)) deberán ser dispuestos en el segmento sensor. En otra realización preferente el sistema de lectura es óptico. En este caso se utilizarán materiales que permitan la penetración del haz de luz en el segmento sensor.

30

d) Uno o varios orificios de salida (Figura 1 (1.4)).

35 De esta manera en el segmento de exposición la muestra podrá ser expuesta a uno o

una mezcla de compuestos químicos y posteriormente el sistema de lectura permitirá monitorear los espermatozoides que pasan por el/los elemento(s) sensor(es).

5 La disposición de los segmentos de ensayo puede ser en paralelo o en continuo. En una realización preferente la disposición de los segmentos de ensayo es en paralelo, de tal forma que nacen de un canal común, permitiendo analizar el comportamiento de distintos espermatozoides de una misma muestra tras la exposición a diferentes compuestos químicos. Esta realización preferente permite un análisis más rápido de la muestra. En otra realización preferente la disposición de los segmentos de ensayo es
10 en continuo, de tal forma que el aparato comprende un único canal en el que los diferentes segmentos de ensayo se disponen de forma sucesiva, permitiendo analizar el comportamiento de los mismos espermatozoides tras la exposición a diferentes compuestos químicos.

15 Así, este dispositivo permite hacer un análisis comparativo entre los diferentes segmentos de exposición en función del tratamiento sufrido por la muestra en cada canal (realización preferente en paralelo) o en cada zona del canal (realización preferente en continuo). Los tratamientos a los que se expone la muestra en los diferentes segmentos
20 ensayo harán que la movilidad espermática se vea afectada y, por tanto, el pase de los espermatozoides por los segmentos de detección, permitiendo así, mediante un análisis comparativo, caracterizar la muestra de semen.

Un ejemplo de análisis es el siguiente. En una realización preferente en la que el sistema de detección está basado en el principio Coulter (US-2656508). La señal se registra
25 frente al tiempo mientras un mecanismo externo hace fluir la muestra de semen a una velocidad de flujo conocida. El paso de los espermatozoides genera pulsos en la señal cuya intensidad es proporcional al tamaño de estos. De esta manera se obtiene la información de cada segmento de ensayo, de la que se puede extraer la cantidad de pulsos, la intensidad de estos y cómo se distribuyen en el tiempo. La cantidad de pulsos
30 en un tiempo determinado permite conocer el número de espermatozoides en un determinado volumen de muestra, ya que la corriente es conocida. Es preciso recordar en este punto que es conocido que los espermatozoides tienden a nadar contracorriente (DOI: 10.7554/eLife.02403). Es por este efecto que la distribución de estos pulsos en el tiempo permite encontrar diferencias entre los diferentes tratamientos, ya que
35 atendiendo al tratamiento que hayan recibido los espermatozoides, se generarán

diferentes distribuciones de pase por los elementos sensores. En el caso de una muestra tratada con un compuesto depresor de la movilidad del espermatozoide la distribución de estos pulsos frente al tiempo será más uniforme que en el caso de una muestra en la que los espermatozoides están activos y pueden nadar a contracorriente, en el que los pulsos se concentrarán en tiempos más avanzados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar esta descripción y para ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado un ejemplo de realización preferente. El juego de dibujos comprende lo siguiente:

Figura 1.- Muestra una vista frontal del dispositivo de la invención. Se muestra una representación de tres segmentos de ensayo dispuestos en paralelo. Se especifican las partes de un segmento de ensayo (1): un orificio de entrada (1.1); un segmento de exposición (1.2), que comprende a su vez un ensanchamiento para la interacción de la muestra con un producto químico determinado (1.2.1) y una parte en serpentín que actúa como mezclador (1.2.2); un segmento sensor (1.3), que comprende a su vez estrechamientos en los canales para limitar el paso de los espermatozoides (1.3.1) y pares de electrodos para la lectura electrónica de la señal (1.3.2); y un orificio de salida (1.4).

Figura 2.- Muestra una vista lateral del dispositivo de la invención. Se muestra el aparato completo ensamblado formado por: una pieza de polidimetilsiloxano (PDMS) que contiene el circuito de microfluídica (1) y una base de un material no conductor que contiene los electrodos para la lectura electrónica de la señal (2).

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

En una realización preferente, el dispositivo se compondría de dos partes fundamentales:

-La primera (Figura 2 (1)) sería una pieza de un material biocompatible, como por ejemplo polidimetilsiloxano (PDMS). Esta pieza contiene surcos en su superficie que

son los canales por los que fluirá la muestra (Figura 1). Las dimensiones preferentes de los canales son de 50 micrómetros de altura y 250 de ancho y los estrechamientos de 50 micrómetros de altura y 25 micrómetros de ancho (las dimensiones de los canales son orientativas). La distribución de los canales que se realizaría preferentemente sería la modalidad en paralelo que se describe en el apartado anterior y como se muestra en la Figura 1. En la forma preferente de realización la pieza de PDMS contiene tres segmentos de ensayo. Los segmentos de exposición contienen un ensanchamiento (Figura 1 (2.1)), en el que se puede depositar un compuesto químico, y una región en serpentin a continuación, que actúa como mezclador. En la realización preferente en uno de los segmentos de ensayo se depositará cafeína, en otro nonoxinol 9 y en el tercero no se depositaría ningún compuesto. Los segmentos sensores de estos tres segmentos de ensayos contienen tres estrechamientos cada uno.

- La segunda (Figura 2 (2)), preferentemente será fabricada en un material que no sea conductor eléctrico y que permita la impresión o evaporación de algún elemento conductor eléctrico en su superficie (por ejemplo, vidrio en el que se evapora oro con la ayuda de una máscara). Esta pieza está diseñada para ensamblarse a la pieza de PDMS ya descrita anteriormente y como se muestra en la Figura 2. Esta pieza contendrá los pares de electrodos que se situarán en los segmentos sensores. Esta disposición preferentemente se realizará como se indica en la Figura 1. Las dimensiones de estos electrodos preferentemente serán de 5 a 100 micrómetros de ancho y tan largos como el ancho del canal (todo el ancho de canal tiene que estar cubierto por el electrodo. La distancia entre dos electrodos de un mismo par de electrodos preferentemente será de 10 a 500 micrómetros. En la realización preferente cada segmento sensor contendrá tres elementos sensores, es decir, tres pares de electrodos separados 2 milímetros entre sí. Los electrodos estarán conectados eléctricamente con una zona específica como se indica en la figura para facilitar el contacto con el dispositivo electrónico responsable de aplicar los potenciales y medir la señal (no forma parte del aparato descrito en esta memoria).

Las dos piezas fundamentales se unen entre sí una vez depositados los compuestos químicos en el ensanchamiento previo al segmento mezclador (Figura 1 (1.2.1)) en estado sólido granulado. La unión entre estas dos piezas puede realizarse por sellado mediante un tratamiento con plasma de oxígeno y/o mediante presión.

35

El funcionamiento del aparato sería de la siguiente manera. La muestra se introduce por el orificio de entrada y fluirá de la misma manera por los diferentes segmentos de ensayo. Primeramente, la muestra pasa por el segmento de exposición en el cual se dispondrán las moléculas químicas que entrarán en contacto con la muestra. Tras entrar
5 en contacto con el compuesto la muestra pasará por un canal en forma de serpentín para facilitar el homogeneizado (Figura 1 (1.2.2)). A continuación, la muestra pasará al segmento sensor, donde se disponen los estrechamientos donde se encuentran los pares de electrodos. La muestra abandonará el dispositivo por el orificio de salida que se indica en la Figura 1 (1.4).

10

15

20

25

30

35

REIVINDICACIONES

1.- Aparato que permite analizar de manera comparativa la calidad de muestras de esperma que comprende:

5

1.1 un puerto de entrada de la muestra

1.2 dos o más canales, conectados al puerto de entrada de la muestra, que permiten el paso de la muestra y que contienen cada uno:

10

1.2.1 una zona que puede contener un compuesto químico que tiene un efecto en la movilidad de los espermatozoides presentes en la muestra

1.2.2 una zona de detección que permite detectar el paso de espermatozoides por la misma

1.3 un puerto de salida de muestra conectado a los canales descritos en el punto 1.2 de estas reivindicaciones.

15

2.- Aparato de medida diseñado con el fin de analizar muestras de esperma necesitando para ello el aparato descrito en la reivindicación 1.

20

3.- Los métodos de análisis que permitan determinar la calidad de muestras de esperma utilizando el aparato descrito en la reivindicación 1.

4.-Aparato según la reivindicación 1 que permite la detección del paso de espermatozoides mediante un sistema de detección eléctrico.

25

5.- Aparato según la reivindicación 1 que permite la detección del paso de espermatozoides mediante un sistema de detección óptico.

Figura 1

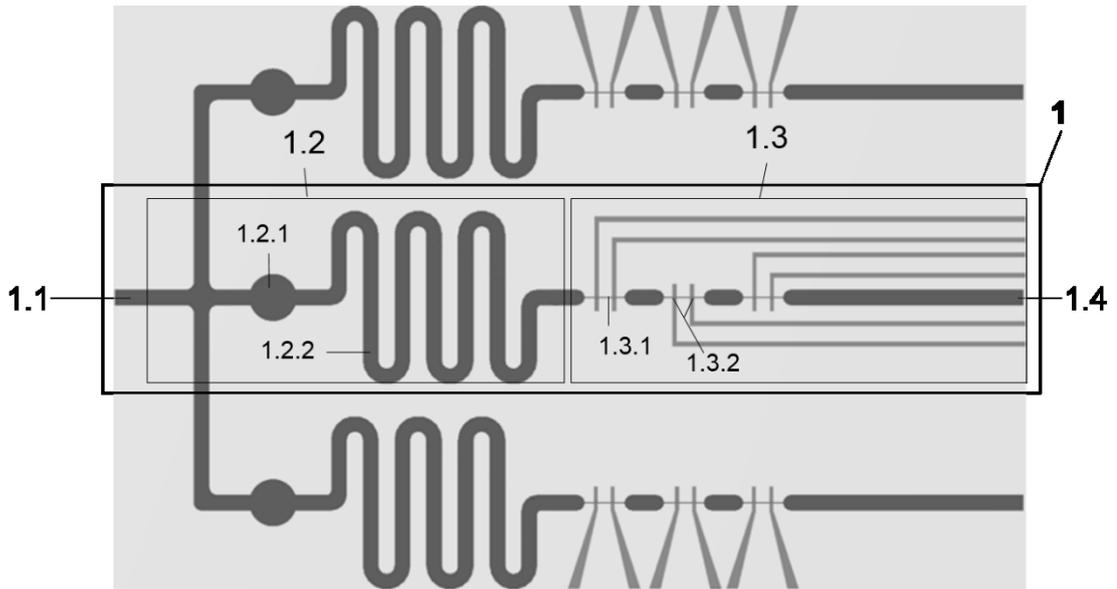
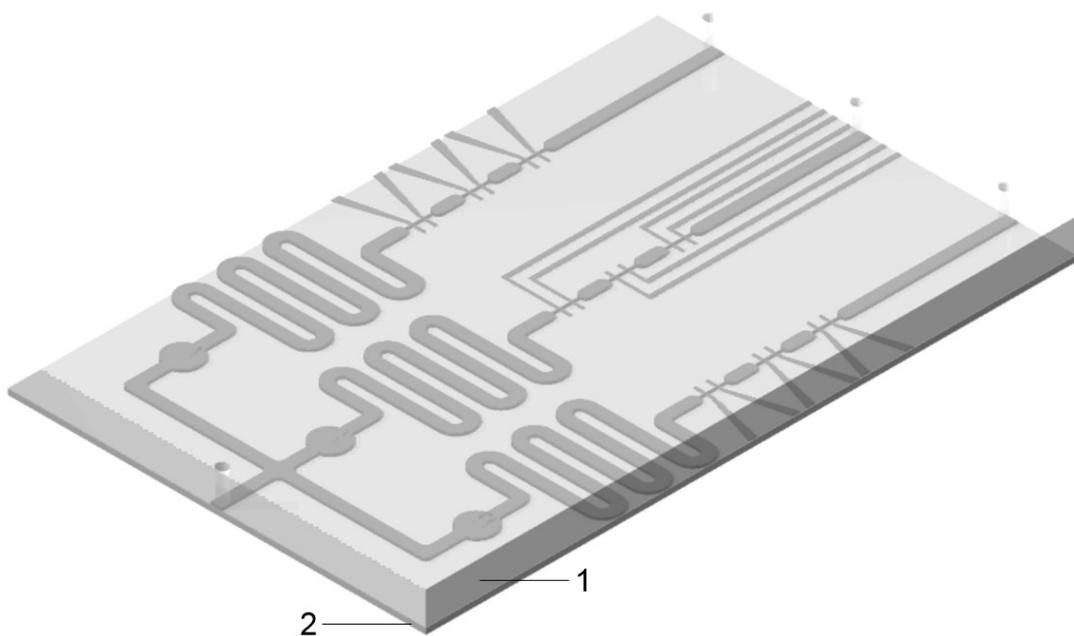


Figura 2





- ②① N.º solicitud: 201830324
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.03.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 5637469 A (WILDING PETER et al.) 10/06/1997, Todo el documento; en particular, columna 11, líneas 38 a 58; ejemplos 8 y 14; figura 14.	1-5
A	CN 105695555 A (UNIV SCIENCE & TECH CHINA) 22/06/2016	1-5
A	US 5427946 A (KRICKA LARRY J et al.) 27/06/1995, Todo el documento; en particular, figuras 1, 5, 6, 9 y 10.	1-5
A	US 2014256032 A1 (WOODER NICHOLAS JAMES et al.) 11/09/2014, Todo el documento; en particular, reivindicaciones y figura 5A.	1-5
A	CN 103773672 A (ZHEJIANG ACADEMY MEDICAL SCI) 07/05/2014	1-5
A	EP 0095386 A1 (NEW ZEALAND DEV FINANCE) 30/11/1983, todo el documento; en particular, reivindicaciones.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.10.2018

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/483 (2006.01)

G01N33/48 (2006.01)

G01N15/12 (2006.01)

G01N33/487 (2006.01)

G01N33/50 (2006.01)

A61D19/00 (2006.01)

A61D19/02 (2006.01)

A61B17/43 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, A61D, A61B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE