

5 **MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA RAMAN AUMENTADA CON NANOPARTÍCULAS**

Campo de la invención

10 La presente invención se sitúa en el sector de la físico-química analítica y la biotecnología reproductiva. Específicamente, se refiere a un método implementado por computador que emplea espectroscopía Raman aumentada por superficies (SERS) e inteligencia artificial para la caracterización automática de la calidad y presencia de patologías en muestras de semen.

15 **Estado de la técnica**

En el estado de la técnica se identifica la patente EP0439893, que se refiere a un “Método y aparato para determinar el índice caracterizado de la motilidad del espermatozoide en células individuales”, utiliza fibra óptica y permite la clasificación de la calidad del semen en inseminación artificial.

20 También se identificó la patente US2004146848, que provee un “Método para medir la concentración total de espermatozoides en una muestra”, donde la medición de dicha muestra se produce a través de la absorbancia óptica de la misma en el rango de los 800 a 1000 nm siendo la concentración total de espermatozoides proporcional al nivel de absorbancia.

25 La patente US2005148098, describe un “Método para usar espectroscopia Raman para obtener el perfil proteico de una muestra biológica”. La solución propone un método para analizar el contenido proteico de una muestra biológica y tener un perfil del mismo a partir de un individuo particular. Las proteínas y los fragmentos de proteínas en la muestra se separan con base a sus propiedades físicas y químicas y se analizan los espectros Raman de manera separada.

30

A diferencia de las soluciones encontradas, la invención que se pretende proteger comprende un método que combina la espectroscopía Raman complementa con el uso de

5 nanopartículas metálicas y analiza los espectros vibracionales obtenidos a través de la misma por medio de un modelo PLSDA, lo que permite determinar la calidad seminal desde su composición. El método, no se limita a la identificación del perfil proteico de las células
esperma, sino que además analiza el perfil de ADN, así como la masa atómica, la geometría y la fuerza de enlace de la célula. Todo ello sin comprometer la estructura química de la
10 muestra celular. Esto permite determinar la calidad del esperma y adicionalmente, identificar los componentes que se ven afectados a nivel celular, permitiendo un análisis más profundo y fundamentado acerca de los factores que afectan al espermatozoide.

Breve descripción de la invención

La presente solución consiste en un método que permite determinar la calidad seminal
15 mediante la espectroscopía Raman aumentada a partir de la acción de nanopartículas metálicas que incrementan la señal Raman en un orden de 10000 a 10000000000000.

El espectro vibratorio obtiene el resultado acumulativo de todas estas vibraciones moleculares, como la masa atómica, la geometría y la fuerza de enlace.

20 Breve descripción de las figuras

Figura 1. La figura 1 muestra un diagrama de flujo del proceso.

Descripción detallada de la invención

25 Al factor masculino solo se le ha dado un enfoque de valoración desde el espermograma y no se ha estudiado el enfoque de la calidad seminal desde su composición y los problemas que subyacen y lo afectan.

La presente solución consiste en un método que permite determinar la calidad seminal mediante la espectroscopía Raman aumentada a partir de la acción de nanopartículas
30 metálicas que incrementan la señal Raman en un orden de 10000 a 10000000000000.

La espectroscopía Raman es una técnica óptica basada en la dispersión inelástica de la luz por moléculas en vibración que puede proporcionar huellas químicas de células, tejidos o biofluidos, en el caso específico del semen permite conocer su composición al obtener

- 5 información adecuada de una muestra sin alterar su perfil químico ya que el semen es una mezcla compleja de varios bioquímicos celulares y no celulares.

El espectro vibratorio obtiene el resultado acumulativo de todas estas vibraciones moleculares, como la masa atómica, la geometría y la fuerza de enlace.

- 10 Para lograr el efecto deseado, se comienza con la recolección del fluido seminal en fresco y el aislamiento de los espermatozoides usando centrifugación; se procede a descartar el sobrenadante y se resuspende en una solución tampón de fosfato salino (PBS) a 10mM.

Posteriormente, se sintetizan las nanopartículas de oro mezclando 300 μ L de una solución AuCl 3 de 20 mM, 65 μ L al 2% de citrato de sodio y 640 μ L de agua desionizada de 18 M Ω . La concentración final de Au es, opcionalmente, de 6 mM.

- 15 Se continua con el depósito de una gota de 5 μ L de nanopartículas de oro sobre un cubreobjetos recubierto con una lámina de oro, ya que el oro no genera señal Raman.

Luego se adicionan 5 μ L de muestra sobre la gota de nanopartícula previamente depositada y se mezcla con la muestra de semen previamente tratada. En esta mezcla, las nanopartículas recubren totalmente a los espermatozoides.

- 20 Sobre la gota de la mezcla resultante se enfoca el láser del espectrómetro Raman y se adquieren los espectros Raman para la muestra de esperma tratada, para un tiempo de adquisición de 1s y con un láser que, en una modalidad preferida de la invención, tiene una potencia de 20 mW. Si se observaba saturación de señal, la potencia del láser debe regularse reduciéndola hasta que la señal pierda la saturación.

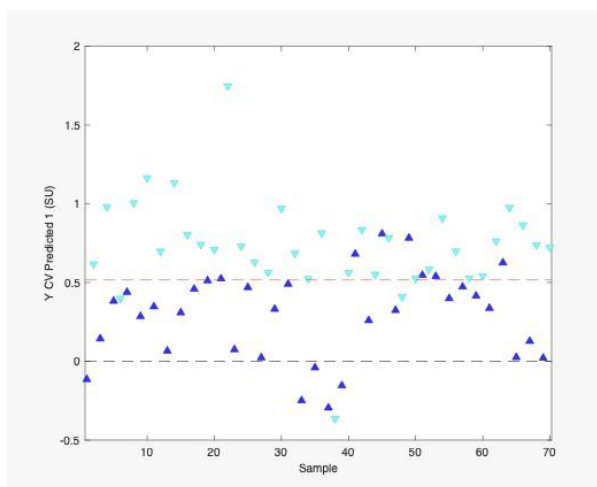
- 25 Luego, el espectro Raman es normalizado usando un preprocesamiento de normalización de vector y se procede a analizar el espectro usando un modelo de clasificación de discriminación de cuadrados parciales mínimos que, en una aplicación preferida de la invención, está integrado en un software. El resultado obtenido, es una clasificación binaria del esperma en sano y no sano (como se expone en la imagen a continuación) con una
30 sensibilidad del 88% y una especificidad del 91%.

Luego, con un análisis comparativo de las señales vibracionales obtenidas de los espectros de cada componente (proteína, ADN, fosfolípidos, etc.), es posible identificar dónde se encuentran los defectos. En una modalidad preferida de la invención, análisis de las señales vibracionales por comparación espectral se realiza usando modelos no supervisados.

- 5 Para la ejecución del método, una unidad de procesamiento controla un espectrómetro Raman con un láser de 20 mW.
- Criterio de Saturación: El sistema monitorea la intensidad de la señal en tiempo real. Se detecta saturación cuando los conteos de fotones alcanzan el límite de cuantificación del sensor CCD (v.g., 65,535 unidades arbitrarias de intensidad en un sensor de 16 bits), manifestándose como un truncamiento de los picos espectrales (mesetas). En este evento, el procesador ordena reducir la potencia del láser en pasos de 2 mW hasta que el pico máximo se sitúe en un rango lineal del 80-90% de la capacidad del sensor.
 - Umbral y Parámetros del Gráfico: En la Figura 1, el eje X (Abcisas) representa la primera función discriminante resultante del modelo PLS-DA (puntuaciones), mientras que el eje Y (Ordenadas) representa la varianza residual. El umbral de clasificación se fija en el valor 0 (cero) del eje discriminante; valores positivos corresponden a muestras con perfiles vibracionales íntegros (biomarcadores estables), mientras que valores negativos indican presencia de alteraciones estructurales o degradación.

25 Ejemplo

- 5 En un ejemplo de aplicación de la invención, se realizó el proceso en una muestra de semen en fresco y los espectros obtenidos fueron preprocesados según se explica *supra*. El resultado obtenido, como se muestra en la figura, permite distinguir las células sanas de las que no lo están. En la figura, se muestra un umbral trazado sobre el eje X, que divide las células sanas, por encima del umbral, de las que no lo están, por debajo del umbral.
- 10 También se observan ejemplos aislados de errores en la discriminación, esto es, células sanas por debajo del umbral. Lo que ayudó a validar el grado de precisión y sensibilidad del método.



- La invención es susceptible de aplicación industrial en centros de inseminación artificial y
- 15 laboratorios de biotecnología porcina, pudiendo integrarse en sistemas de control de calidad automatizados para la producción masiva de dosis seminales con resultados consistentes y reproducibles.