

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 897 777**

51 Int. Cl.:

G01N 1/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2016** **PCT/US2016/068204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017** **WO17112844**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2016** **E 16880078 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021** **EP 3394589**

54 Título: **Método para identificar un enfoque para lograr la fecundación de mamíferos y periodo de tiempo para la inseminación**

30 Prioridad:

23.12.2015 US 201562387348 P

15.01.2016 US 201662279315 P

28.04.2016 US 201662328876 P

28.04.2016 US 201662328885 P

15.11.2016 US 201662422279 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2022

73 Titular/es:

ANDROVIA LIFE SCIENCES LLC (100.0%)

187 Mill Lane

Mountainside, NJ 07092, US

72 Inventor/es:

TRAVIS, ALEXANDER, J.;

CARDONA, CRISTINA;

MOODY, MELISSA, A.;

SIMPSON, ALANA, J. y

OSTERMEIER, G., CHARLES

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 897 777 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 identificar un enfoque para lograr la fecundación de mamíferos y periodo de tiempo para la inseminación

Campo de la invención

Esta invención se refiere de manera general al campo de fecundidad masculina y más específicamente proporciona métodos de identificación de un enfoque reproductor para lograr la fecundación de mamíferos.

Antecedentes

El diagnóstico de la esterilidad masculina se basa predominantemente en los resultados del análisis de semen convencional para determinar la concentración, movilidad total, movilidad progresiva, volumen, pH, viscosidad y/o morfología. Sin embargo, las mediciones de morfología, movilidad y concentración de espermatozoides no evalúan el potencial de fecundación, incluyendo los cambios complejos que experimentan los espermatozoides durante la residencia dentro del aparato reproductor femenino. Además de los desafíos asociados con evaluar el potencial de fecundación, con frecuencia se usa crioconservación para conservar espermatozoides y conservar la fecundidad masculina durante periodos de tiempo prolongados. Desafortunadamente, la congelación y descongelación puede afectar negativamente a la viabilidad y función de espermatozoides. Se notifica que la crioconservación altera la capacitación y desplaza/limita el intervalo de fecundación.

Pruebas de fecundidad recién desarrolladas deben determinar la capacidad de espermatozoides para fecundar, así como iniciar y mantener un embarazo (Oehninger *et al.*, "Sperm functional tests", *Fertil Steril.* 102: 1528-33 (2014); Wang *et al.*, "Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests", *Fertil Steril.* 102: 1502-07 (2014)). Aunque los espermatozoides recién eyaculados parecen morfológicamente maduros y móviles, son incapaces de fecundar. En primer lugar deben experimentar un proceso de maduración conocido como "capacitación", que hace que puedan fecundar (Austin, "The capacitation of the mammalian sperm", *Nature*, 170: 326 (1952); Chang, "Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes", *Nature*, 168: 697-8 (1951)). En la mayoría de las especies, la capacitación depende de la retirada de esteroides a partir de la membrana plasmática de espermatozoides (eflujo de esteroles) y el influjo de iones bicarbonato y calcio (Baldi *et al.*, "Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa", *J Androl.* 12: 323-30 (1991); Bedu-Addo *et al.*, "Bicarbonate and bovine serum albumin reversibly 'switch' capacitation-induced events in human spermatozoa", *Mol Hum Reprod.*, 11: 683-91 (2005); Cohen *et al.*, "Lipid modulation of calcium flux through Cav2.3 regulates acrosome exocytosis and fertilization", *Dev Cell.* 28: 310-21 (2014); Gadella *et al.*, "Bicarbonate and its role in mammalian sperm function", *Anim. Reprod. Sci.* 82: 307-19 (2004)). El eflujo de esteroides que se produce durante la capacitación de espermatozoides cambia los patrones de fluidez de membrana y permite la redistribución de componentes de membrana específicos (Cohen *et al.* 2014; Cross, "Role of cholesterol in sperm capacitation", *Biol Reprod.* 59: 7-11 (1998); Selvaraj *et al.*, "Mechanisms underlying the micron-scale segregation of sterols and G_{M1} in live mammalian sperm", *J Cell Physiol.* 218: 522-36 (2007); Selvaraj *et al.*, "G_{M1} dynamics as a marker for membrane changes associated with the process of capacitation in murine and bovine spermatozoa", *J Androl.* 28: 588-99 (2009)).

Actualmente, hay pocos biomarcadores de capacitación sensibles y simples, si es que hay alguno, adecuados para su aplicación clínica. Por ejemplo, la fosforilación de residuos de tirosina se ha detallado bien en asociación con la capacitación (Battistone *et al.*, "Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases", *Mol. Human Reprod.* 19: 570-80 (2013); Osheroff *et al.*, "Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation", *Mol. Human Reprod.* 5: 1017-26 (1999); Visconti *et al.*, "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation", *Development*, 121: 1129-37 (1995)). Sin embargo, evaluar estos acontecimientos puede tardar múltiples días y proporcionar sólo una evaluación semicuantitativa, haciendo que sea inapropiado para la evaluación clínica de la fecundidad masculina.

Desde hace algún tiempo se ha sabido que los espermatozoides deben experimentar eflujo de esteroles para poder fecundar (Osheroff *et al.* 1999; Travis *et al.*, "The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa", *The Journal of Clinical Investigation*, 110: 731-36 (2002)). Además, el colesterol y otros lípidos, tales como el gangliósido G_{M1}, se organizan en microdominios dentro de la membrana plasmática de los espermatozoides (Asano *et al.*, "Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: Identification of three distinct sub-types of membrane rafts", *J Cell Physiol.*, 218: 537-48 (2009); Asano *et al.*, "Characterization of the proteomes associating with three distinct membrane raft sub-types in murine sperm", *Proteomics*, 10: 3494-505 (2010); Travis *et al.*, "Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa", *Dev Biol.*, 240: 599-610 (2001); Selvaraj *et al.* 2009). Estas balsas de membrana consolidan rutas de señalización, haciendo que sean candidatos sensibles para mediar en la función de espermatozoides. De manera interesante, se han medido cambios predecibles en

patrones de localización de G_{M1} en espermatozoides tanto de ratón como de toro que se han estimulado para la capacitación (Selvaraj *et al.* 2007). Adicionalmente, G_{M1} regula la actividad de un canal de calcio de tipo R, activando un flujo de calcio transitorio que es esencial para la exocitosis de acrosoma y, por tanto, la fecundación satisfactoria (Cohen *et al.* 2014). Paniza *et al.*, "A bioassay to measure fertilization competence of human spermatozoa", Poster, 2014, indicaron que la capacitación de espermatozoides se reflejaba en el patrón de localización de G_{M1} . Estos hallazgos sustentan el uso de patrones de localización de G_{M1} para evaluar la función de espermatozoides y por consiguiente la fecundidad masculina.

Se han identificado diversos patrones de localización de G_{M1} y se han asociado con la capacitación o ausencia de capacitación. En particular, se han asociado patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA) y patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM) con la capacitación en espermatozoides bovinos y humanos. La capacitación de espermatozoides puede expresarse de manera cuantitativa como un valor de Cap-Score™, generado mediante la prueba de función de espermatozoides Cap-Score™ ("prueba Cap-Score™" o "Cap-Score"), que se define como ([número de patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA) + número de patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM)]/número total de patrones de localización marcados con G_{M1}) en el que se mide el número de cada patrón de localización y después se convierte en última instancia en una puntuación en porcentaje. Además de patrones de localización de G_{M1} en APM y patrones de localización de G_{M1} en AA, los otros patrones de localización marcados incluyeron patrones de localización de G_{M1} en células de revestimiento, patrones de localización de G_{M1} intermedios (inter.), patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática post-acrosómica (PAPM), patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical/post-acrosoma (AA/PA), patrones de localización de G_{M1} en segmento ecuatorial (ES) y patrones de localización de G_{M1} difusos (dif.). (Travis *et al.*, "Impacts of common semen handling methods on sperm function", The Journal of Urology, 195 (4), e909 (2016)).

Sumario de la invención

La invención proporciona un método para identificar un enfoque para lograr la fecundación de mamíferos que comprende las etapas de: obtener mediante obtención de imágenes una o más imágenes de fluorescencia de t_0 a partir de una primera muestra de espermatozoides capacitados *in vitro* tratada con un marcador de fluorescencia, en el que los espermatozoides presentan uno o más patrones de localización de G_{M1} , en el que dichas imágenes de fluorescencia de t_0 se obtienen a tiempos tras la capacitación *in vitro* seleccionados de: de 0,1 horas a 5 horas; de 0,1 horas a 8 horas; de 0,1 a 12 horas; o de 0,1 horas a 18 horas; medir un número de patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA), un número de patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM) y un número total de patrones de localización de G_{M1} presentados en una o más imágenes de fluorescencia de t_0 para determinar un porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 ; comparar el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 medido con un porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] para determinar un estado de fecundidad; e identificar un enfoque reproductor para lograr la fecundación de mamíferos basándose en el estado de fecundidad determinado, en el que un porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] correspondiente a: más del 35% indica un estado de fecundidad alta; una desviación estándar por debajo del 35% indica un estado de fecundidad media; y dos o más desviaciones estándar por debajo del 35% indica un estado de fecundidad baja.

En una realización del método de la invención, si el macho tiene una concentración de espermatozoides al menos normal, entonces el enfoque reproductor para el estado de fecundidad alta se selecciona del grupo que consiste en: coito, inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; el enfoque reproductor para el estado de fecundidad media se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical; inseminación intrauterina (IUI); capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; o fecundación *in vitro* (IVF) o capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*; o el enfoque reproductor para el estado de fecundidad baja se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia intratubárica de gametos (GIFT), capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos, inseminación subzonal (SUZI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

En una realización adicional del método de la invención, si el macho tiene una concentración de espermatozoides inferior a la normal, entonces el enfoque reproductor para el estado de fecundidad alta se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; el enfoque reproductor para el estado de fecundidad media se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la

inseminación intrauterina; fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*; o el enfoque reproductor para el estado de fecundidad baja se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia intratubárica de gametos (GIFT), capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos, inseminación subzonal (SUZI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

En una realización adicional, si el enfoque reproductor corresponde a la capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferencia intratubárica de gametos (GIFT) o inseminación subzonal (SUZI), entonces el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

En un caso de cada una de las realizaciones anteriores, el método puede comprender además las etapas de: obtener mediante obtención de imágenes una o más imágenes de fluorescencia de t_1 a partir de una segunda muestra de espermatozoides capacitados *in vitro* obtenida a partir del mismo macho que la primera muestra y tratada con un marcador de fluorescencia que presenta uno o más patrones de localización de G_{M1} , en el que dichas imágenes de fluorescencia de t_1 se obtienen a un tiempo tras la capacitación t_1 , en el que t_1 es mayor que t_0 o mayor de 18 horas; medir un número de patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA), un número de patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM) y un número total de patrones de localización de G_{M1} presentados en una o más imágenes de fluorescencia de t_1 para determinar un porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 ; comparar el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 con el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 para determinar un tiempo de capacitación *in vivo*, en el que una diferencia en el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 y el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 de más de una desviación estándar con respecto a un patrón del 35% indica un tiempo de capacitación *in vivo* de más de 12 horas; y una diferencia de menos de una desviación estándar con respecto al patrón del 35% indica un tiempo de capacitación *in vivo* de menos de 12 horas; además, si se determina que el tiempo de capacitación *in vivo* es de más de 12 horas, entonces se determina un estado de fecundidad de t_1 basándose en una comparación del porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 medido con el porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM]; o, si se determina que el tiempo de capacitación *in vivo* es de menos de 12 horas, entonces se determina un estado de fecundidad de t_1 basándose en una comparación del porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] con el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 medido; y basándose en el estado de fecundidad de t_1 del macho y el tiempo de capacitación *in vivo*, identificar un periodo de tiempo para la inseminación y un enfoque reproductor para usar con el fin de lograr la fecundación.

En una realización de los métodos de la invención, la etapa de identificación también puede basarse en uno o más de los siguientes: datos demográficos de paciente, estado reproductor de la pareja femenina, concentración de espermatozoides, movilidad total, movilidad progresiva, volumen de semen, pH de semen, viscosidad de semen y/o morfología de espermatozoides y combinaciones de los mismos.

En una realización de los métodos de la invención, los más de un patrón de localización de G_{M1} pueden incluir patrón de localización de G_{M1} en AA, patrón de localización de G_{M1} en APM, patrón de localización de G_{M1} en células de revestimiento, patrón de localización de G_{M1} inter., patrón de localización de G_{M1} en PAPM, patrón de localización de G_{M1} en AA/PA, patrón de localización de G_{M1} en ES y patrón de localización de G_{M1} dif.

En una realización de los métodos de la invención, los espermatozoides pueden haberse tratado *in vitro* con condiciones de capacitación durante un periodo de tiempo de capacitación de: al menos una hora; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; durante un periodo de tiempo de capacitación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 24 horas; 12 horas y 24 horas; o 18 horas y 24 horas.

En una realización de los métodos de la invención, los espermatozoides capacitados *in vitro* pueden haberse tratado con un agente de fijación durante un periodo de tiempo de fijación de: al menos 0,5 horas; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; al menos 30 horas; al menos 36 horas; o al menos 48 horas, durante un periodo de tiempo de fijación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 18 horas; 6-18 horas; 6-24 horas; 12 horas y 24 horas; 18 horas y 24 horas; 18-30 horas; 18-36 horas; 24-30 horas; 24-26 horas; 18-48 horas; 24-48 horas; o 36-48 horas.

En una realización de los métodos de la invención, los espermatozoides pueden haberse tratado con procedimientos de criopreservación y almacenado antes de tratarse *in vitro* con condiciones de capacitación.

5 Breve descripción de los dibujos

El sumario anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se entenderán mejor cuando se lean junto con los dibujos adjuntos.

- 10 La figura 1A ilustra una representación gráfica en la que el valor de Cap-Score promedio se muestra en el eje de las x y la desviación estándar correspondiente se muestra en el eje de las y. Se encontró que la DE promedio para todas las imágenes era de tres (3) y se muestra mediante la línea horizontal continua. Las líneas discontinuas muestran la dependencia lineal de la DE ($y = 0,06x + 0,02$; $r=0,69$; $p=0,00$).
- 15 La figura 1B ilustra una representación gráfica en la que el valor de Cap-Score promedio se muestra en el eje de las x y el coeficiente de variación se muestra en el eje de las y. Se encontró que el CoV para todas las imágenes era de trece (13) y se muestra mediante la línea horizontal continua. Las líneas discontinuas muestran la dependencia lineal del CoV ($y = -0,32x + 0,22$; $r=-0,84$; $p=0,00$) con respecto al promedio de Cap-Score.
- 20 La figura 2A ilustra la reproducibilidad de valores de Cap-Score medios entre operarios. Se obtuvieron diez imágenes ensambladas, que contenían hasta 5.000 espermatozoides cada una, para "inferior a la normal" (más de una (1) DE por debajo del resultado de Cap-Score medio para una población de hombres normales). Dos evaluadores diferentes determinaron valores de Cap-Score remuestreando aleatoriamente cada imagen 20 veces y contando 150 células cada vez (evaluador 1 barras blancas, evaluador 2 barras grises).
- 25 La figura 2B ilustra la reproducibilidad de valores de Cap-Score medios entre operarios. Se obtuvieron diez imágenes ensambladas, que contenían hasta 5.000 espermatozoides cada una, para "supuesta normal" clasificado como más de una (1) DE por debajo del resultado de Cap-Score medio para una población de hombres normales. Dos evaluadores diferentes determinaron valores de Cap-Score remuestreando aleatoriamente cada imagen 20 veces y contando 150 células cada vez (evaluador 1 barras blancas, evaluador 2 barras grises).
- 30 La figura 3A ilustra la repetibilidad de varianzas de Cap-Score entre operarios. Se obtuvieron diez imágenes ensambladas, que contenían hasta 5.000 espermatozoides cada una, para "inferior a la normal" (más de una (1) DE por debajo del resultado de Cap-Score medio para una población de hombres normales. Dos evaluadores diferentes determinaron valores de Cap-Score remuestreando aleatoriamente cada imagen 20 veces y contando 150 células cada vez (evaluador 1 barras blancas, evaluador 2 barras grises).
- 35 La figura 3B ilustra la repetibilidad de varianzas de Cap-Score entre operarios. Se obtuvieron diez imágenes ensambladas, que contenían hasta 5.000 espermatozoides cada una, para "supuesta normal" clasificado como más de una (1) DE por debajo del resultado de Cap-Score medio para una población de hombres normales. Dos evaluadores diferentes determinaron valores de Cap-Score remuestreando aleatoriamente cada imagen 20 veces y contando 150 células cada vez (evaluador 1 barras blancas, evaluador 2 barras grises).
- 40 La figura 4 ilustra diversos patrones de localización de G_{M1} en espermatozoides humanos normales y espermatozoides de machos estériles que se forman en condiciones de capacitación *in vitro*.

Descripción detallada

- 50 Tal como se describe en el presente documento, el periodo de tiempo para la capacitación de espermatozoides entre y dentro de diferentes machos varía. Se ha descubierto que puede usarse la determinación del periodo de tiempo para la capacitación de espermatozoides de un macho para identificar un periodo de tiempo para la inseminación y un enfoque reproductor para usar durante el periodo de tiempo de inseminación con el fin de lograr la fecundación.

55 G_{M1} se refiere a monosialotetrahexosilgangliósido y es un miembro de la serie ganglio de gangliósidos.

- 60 Para espermatozoides humanos, se han notificado ocho patrones de localización de G_{M1} diferentes cuando los espermatozoides estaban en condiciones de capacitación *in vitro* tal como se ilustra en la figura 4. Para visualizar los patrones de ubicación, se trataron los espermatozoides capacitados con molécula de marcaje para G_{M1} , tal como toxina del cólera b, que tiene un marcador detectable por fluorescencia en la misma.

- 65 Inter. se caracteriza por un espermatozoide en el que la gran mayoría de la señal de fluorescencia está en una banda alrededor del segmento ecuatorial, con algo de señal en la membrana plasmática que recubre el acrosoma. Habitualmente hay un gradiente de la señal de fluorescencia, con la mayor parte en el segmento ecuatorial y luego progresivamente menos hacia la punta. Con frecuencia hay un aumento de la intensidad de

señal de fluorescencia en los bordes de la cabeza de espermatozoide en la banda a través del segmento ecuatorial.

Acrosoma apical "AA" se caracteriza por un espermatozoide en el que la señal de fluorescencia está concentrada hacia la punta apical, con aumento del brillo y reducción del área con señal.

La membrana plasmática acrosómica "APM" se caracteriza por un espermatozoide que muestra una señal de fluorescencia distribuida en la membrana plasmática que recubre el acrosoma. O bien se observa una señal de APM a partir de la banda inter. ecuatorial brillante moviéndose en sentido apical hacia la punta o bien puede empezar más hacia la punta y encontrarse en una región más pequeña, dado que forma una continuidad con AA.

La membrana plasmática post-acrosómica "PAPM" se caracteriza por un espermatozoide en el que la señal de fluorescencia está exclusivamente en la membrana plasmática post-acrosómica.

Acrosoma apical/post-acrosoma "AA/PA" se caracteriza por un espermatozoide en el que la señal de fluorescencia está ubicada tanto en la membrana plasmática que recubre el acrosoma como en la membrana plasmática post-acrosómica. El segmento ecuatorial no muestra ninguna señal de fluorescencia.

El segmento ecuatorial "ES" se caracteriza por un espermatozoide que tiene una señal de fluorescencia brillante ubicada únicamente en el segmento ecuatorial. Puede ir acompañada por engrosamiento de la cabeza del espermatozoide a través de la región ecuatorial.

Difuso "dif." se caracteriza por un espermatozoide que tiene una señal de fluorescencia difusa ubicada a lo largo de toda la cabeza del espermatozoide.

Célula de revestimiento se caracteriza por un espermatozoide que tiene una señal de fluorescencia difusa encima de la región post-acrosómica y en la membrana plasmática que recubre el acrosoma así como la parte inferior del segmento ecuatorial (es decir, la banda post-acrosómica/ecuatorial). Falta una señal de fluorescencia alrededor del segmento ecuatorial.

Los diversos patrones de localización de G_{M1} se identifican tratando los espermatozoides con molécula de marcaje para G_{M1} , tal como toxina del cólera b, que tiene un marcador detectable por fluorescencia en la misma. Después se visualizan los espermatozoides marcados usando un microscopio de fluorescencia tal como conocen los expertos en la técnica.

El valor de Cap-Score se define como la razón de [el número de patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA) + el número de patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM)] dividido entre [el número total de patrones de localización marcados con G_{M1}]. (Travis *et al.*, "Impacts of common semen handling methods on sperm function", The Journal of Urology, 195 (4), e909 (2016)). Para obtener el número de patrones de localización de G_{M1} diferentes, se cuenta el número de patrones de localización para al menos 100 espermatozoides.

Para los fines de esta solicitud, " t_0 " corresponde al número de horas después de tratar los espermatozoides con condiciones de capacitación *in vitro* y se selecciona de 0,1 horas a 5 horas; de 0,1 horas a 8 horas; de 0,1 a 12 horas; o de 0,1 horas a 18 horas.

Para los fines de esta solicitud, " t_1 " corresponde al número de horas después de tratar los espermatozoides con condiciones de capacitación *in vitro* y es mayor de 18 horas o mayor que t_0 .

Para los fines de esta solicitud, se entiende que imágenes significa (i) imágenes digitales; (ii) patrones de G_{M1} directamente observados por un operario a través de un ocular; o (iii) patrones de G_{M1} distinguidos mediante citometría de flujo.

Para los fines de esta solicitud, se entiende que "inseminación" tiene un significado que depende del enfoque reproductor. Por ejemplo, para "coito", se entiende que inseminación significa introducción de espermatozoides en el aparato reproductor de una hembra. Por ejemplo, para "inseminación intracervical (ICI)", se entiende que inseminación significa introducción de espermatozoides en el cuello uterino de una hembra. Para "inseminación intrauterina (IUI)", se entiende que inseminación significa cuando se introducen espermatozoides en el útero de una hembra. Para "fecundación *in vitro* (IVF)", se entiende que inseminación significa cuando se introducen espermatozoides en una gotita de medio que contiene óvulos (ovocitos) para permitir la incubación conjunta de espermatozoides y óvulo(s). Para "capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*", se entiende que inseminación significa cuando se introducen espermatozoides en una gotita de medio que contiene óvulos (ovocitos) para permitir la incubación conjunta de espermatozoides y óvulo(s). Para "inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)", se entiende que inseminación significa inyección de espermatozoides o espermatozoides previamente capacitados en un óvulo. Para "transferencia intratubárica de gametos (GIFT)", se entiende que inseminación significa inyección de espermatozoides o espermatozoides

previamente capacitados y óvulo(s) en las trompas de Falopio de una hembra. Para "inseminación subzonal (SUZI)", se entiende que inseminación significa inyección de un único espermatozoide o un único espermatozoide previamente capacitado justo por debajo de la zona pelúcida. Para los fines de esta solicitud, el término "crioconservación" se refiere a todo el procedimiento de congelar, almacenar y descongelar las células para su uso.

Tal como se usa a continuación en el presente documento, el macho es un mamífero. En una realización, el macho es un ser humano. En otra realización, el macho es un mamífero no humano. En una realización de este tipo, el macho es un animal de compañía. En otra realización, el macho es un animal para agricultura. En una realización de este tipo, el macho es un animal canino, felino, equino, bovino, oveja, cabra, cerdo, camélido o búfalo.

En una realización, la divulgación proporciona un método para identificar un enfoque para lograr la fecundación de mamíferos. Se trata una primera muestra de espermatozoides capacitados *in vitro* con un marcador de fluorescencia. Se obtienen una o más imágenes de fluorescencia de t_0 mediante obtención de imágenes en la que las imágenes presentan uno o más patrones de localización de G_{M1} asociados con espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia de t_0 . Las imágenes de fluorescencia de t_0 se obtienen a tiempos tras la capacitación *in vitro* seleccionados de: de 0,1 horas a 5 horas; de 0,1 horas a 8 horas; de 0,1 a 12 horas; o de 0,1 horas a 18 horas (t_0). Se mide un número de patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA), un número de patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM) y un número total de patrones de localización de G_{M1} para los espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia de t_0 presentados en una o más imágenes de fluorescencia de t_0 para determinar un porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 . Se determina un estado de fecundidad asociado con un porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 medido en el que un porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] correspondiente a: más del 35% indica un estado de fecundidad alta; una desviación estándar por debajo del 35% indica un estado de fecundidad media; y dos o más desviaciones estándar por debajo del 35% indica un estado de fecundidad baja. Se compara el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA y patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 medido con el porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM]. Se identifica un enfoque reproductor basándose en el estado de fecundidad con el fin de lograr la fecundación.

En un caso de la realización anterior, en la que el macho tiene una concentración de espermatozoides al menos normal: (i) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad alta se selecciona del grupo que consiste en: coito, inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; (ii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad media se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical; inseminación intrauterina (IUI); capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; o fecundación *in vitro* (IVF) o capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*; o (iii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad baja se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia intratubárica de gametos (GIFT), capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos, inseminación subzonal (SUZI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

En otro caso de la realización anterior, en la que el macho tiene una concentración de espermatozoides inferior a la normal: (i) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad alta se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; (ii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad media se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, o (iii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad baja se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia intratubárica de gametos (GIFT), capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos, inseminación subzonal (SUZI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

Para las realizaciones anteriores, en las que los espermatozoides se someten a capacitación previa y el enfoque reproductor corresponde a la capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, el periodo de tiempo para la capacitación previa corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o

más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

- 5 Para realizaciones en las que los espermatozoides se someten a capacitación previa y el enfoque reproductor corresponde a inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), el periodo de tiempo para la capacitación
previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más
estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la
inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la
10 inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

- Para realizaciones en las que los espermatozoides se someten a capacitación previa y el enfoque reproductor
corresponde a transferencia intratubárica de gametos (GIFT), el periodo de tiempo para la capacitación previa
antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos
15 para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación;
12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas
antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

- Para realizaciones en las que los espermatozoides se someten a capacitación previa y el enfoque reproductor
corresponde a inseminación subzonal (SUZI), el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la
inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la
capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación;
20 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas
antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

- 25 En un caso de cada una de las realizaciones anteriores, se trata una segunda muestra de espermatozoides
capacitados *in vitro* con un marcador de fluorescencia, en la que la segunda muestra de espermatozoides
capacitados *in vitro* y la primera muestra de espermatozoides capacitados *in vitro* están asociadas con el mismo
macho. Se obtienen una o más imágenes de fluorescencia de t_1 que presentan uno o más patrones de
30 localización de G_{M1} asociados con espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia de t_1
mediante obtención de imágenes, en las que las imágenes de fluorescencia de t_1 se obtienen a un tiempo tras la
capacitación t_1 , en las que t_1 se selecciona de mayor que t_0 o mayor de 18 horas. Se miden un número de
patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA), un número de patrones de localización de G_{M1} en
membrana plasmática acrosómica (APM) y un número total de patrones de localización de G_{M1} para los
35 espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia de t_1 presentados en una o más imágenes de
fluorescencia de t_1 para determinar un porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de
localización de G_{M1} en APM] de t_1 . Se compara el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más
patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 con el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más
patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 para determinar un tiempo de capacitación *in vivo* seleccionado de
40 un tiempo de capacitación *in vivo* tardío de más de 12 horas o un tiempo de capacitación *in vivo* convencional de
menos de 12 horas. Una diferencia en el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de
localización de G_{M1} en APM] de t_0 y el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de
localización de G_{M1} en APM] de t_1 correspondiente a: más de una desviación estándar con respecto a un patrón
del 35% indica un tiempo de capacitación *in vivo* tardío de más de 12 horas; o menos de una desviación estándar
45 con respecto al patrón del 35% indica un tiempo de capacitación *in vivo* convencional de menos de 12 horas.
Además, cuando una diferencia en el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de
localización de G_{M1} en APM] de t_0 y el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de
localización de G_{M1} en APM] de t_1 correspondiente a: más de una desviación estándar con respecto a un patrón
del 35%, entonces se determina un estado de fecundidad de t_1 basándose en una comparación del porcentaje de
50 [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 medido con el
porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en
APM]; o menos de una desviación estándar con respecto a un patrón del 35%, entonces se determina un estado
de fecundidad de t_1 basándose en una comparación del porcentaje de referencia de [patrones de localización de
 G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] con el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1}
55 en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 medido o el porcentaje de [patrones de localización de
 G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 medido. Basándose en el estado de fecundidad
de t_1 del macho y el tiempo de capacitación *in vivo*, se identifican un periodo de tiempo para la inseminación y un
enfoque reproductor para usar con el fin de lograr la fecundación.

- 60 En un caso de la realización anterior, en la que el macho tiene una concentración de espermatozoides al menos
normal y un tiempo de capacitación *in vivo* tardío: (i) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1
alta se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento del coito al tiempo de capacitación *in vivo*
tardío; modificar el momento de la inseminación intracervical (ICI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío;
modificar el momento de la inseminación intrauterina (IUI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; capacitación
65 previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical o capacitación previa de espermatozoides
antes de la inseminación intrauterina; (ii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 media se

selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento de la inseminación intracervical (ICI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación intrauterina (IUI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la fecundación *in vitro* (IVF) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical; inseminación intrauterina (IUI);
 5 capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; o capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, o (iii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 baja se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento de la fecundación *in vitro* (IVF) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la transferencia intratubárica de gametos (GIFT) al
 10 tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación subzonal (SUZI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

En un caso de la realización anterior, en la que el macho tiene una concentración de espermatozoides inferior a la normal y un tiempo de capacitación *in vivo* tardío: (i) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 alta se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento del coito al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación intracervical (ICI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación intrauterina (IUI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; capacitación
 20 previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; (ii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 media se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento de la inseminación intracervical (ICI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación intrauterina (IUI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la fecundación *in vitro* (IVF) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; o capacitación previa de espermatozoides antes de la
 25 fecundación *in vitro*; o (iii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 baja se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento de la fecundación *in vitro* (IVF) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), modificar el momento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la transferencia intratubárica de gametos (GIFT) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación subzonal (SUZI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío, capacitación previa de espermatozoides
 30 antes de la fecundación *in vitro*, capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

En otro caso de la realización anterior, en la que el macho tiene una concentración de espermatozoides al menos normal y un tiempo de capacitación *in vivo* convencional: (i) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad
 40 de t_1 alta se selecciona del grupo que consiste en: coito, inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; (ii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 media se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical; inseminación intrauterina (IUI); capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; o fecundación *in vitro* (IVF) o capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*; o (iii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1
 45 baja se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia intratubárica de gametos (GIFT), capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos, inseminación subzonal (SUZI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

En otro caso de la realización anterior, en la que el macho tiene una concentración de espermatozoides inferior a la normal y un tiempo de capacitación *in vivo* convencional: (i) el enfoque reproductor para el estado de
 55 fecundidad de t_1 alta se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; (ii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 media se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación
 60 previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, o (iii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 baja se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides,
 65 transferencia intratubárica de gametos (GIFT), capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos, inseminación subzonal (SUZI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la

inseminación subzonal.

Para las realizaciones anteriores, en las que los espermatozoides se someten a capacitación previa y el enfoque reproductor corresponde a la capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, el periodo de tiempo para la capacitación previa corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

Para realizaciones en las que los espermatozoides se someten a capacitación previa y el enfoque reproductor corresponde a inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

Para realizaciones en las que los espermatozoides se someten a capacitación previa y el enfoque reproductor corresponde a transferencia intratubárica de gametos (GIFT), el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

Para realizaciones en las que los espermatozoides se someten a capacitación previa y el enfoque reproductor corresponde a inseminación subzonal (SUZI), el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

En un caso de cada una de las realizaciones anteriores, la etapa de identificación también se basa en uno o más de los siguientes: datos demográficos de paciente, estado reproductor de la pareja femenina, concentración de espermatozoides, movilidad total, movilidad progresiva, volumen de semen, pH de semen, viscosidad de semen y/o morfología de espermatozoides y combinaciones de los mismos.

En un caso de cada una de las realizaciones anteriores, los más de un patrón de localización de G_{M1} incluyen patrón de localización de G_{M1} en AA, patrón de localización de G_{M1} en APM, patrón de localización de G_{M1} en células de revestimiento, patrón de localización de G_{M1} inter., patrón de localización de G_{M1} en PAPM, patrón de localización de G_{M1} en AA/PA, patrón de localización de G_{M1} en ES y patrón de localización de G_{M1} dif.

En un caso de cada una de las realizaciones anteriores, se tratan espermatozoides *in vitro* con condiciones de capacitación durante un periodo de tiempo de capacitación de: al menos una hora; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; durante un periodo de tiempo de capacitación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 24 horas; 12 horas y 24 horas; o 18 horas y 24 horas.

En un caso de cada una de las realizaciones anteriores, los espermatozoides capacitados *in vitro* se tratan con un agente de fijación durante un periodo de tiempo de fijación de: al menos 0,5 horas; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; al menos 30 horas; al menos 36 horas; o al menos 48 horas, durante un periodo de tiempo de fijación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 18 horas; 6-18 horas; 6-24 horas; 12 horas y 24 horas; 18 horas y 24 horas; 18-30 horas; 18-36 horas; 24-30 horas; 24-26 horas; 18-48 horas; 24-48 horas; o 36-48 horas.

En un caso de cada una de las realizaciones anteriores, los espermatozoides se trataron con procedimientos de crioconservación y se almacenaron antes de tratarse *in vitro* con condiciones de capacitación.

La divulgación describe un método adicional para identificar un enfoque para lograr la fecundación de mamíferos. Se trata una muestra de espermatozoides capacitados *in vitro* de t_0 con un marcador de fluorescencia y se trata una muestra de espermatozoides capacitados *in vitro* de t_1 con un marcador de fluorescencia. Se obtienen una o más imágenes de fluorescencia de t_0 mediante obtención de imágenes, presentando las imágenes de fluorescencia de t_0 uno o más patrones de localización de G_{M1} asociados con espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia de t_0 . Y se obtienen una o más imágenes de fluorescencia de t_1 , presentando la fluorescencia de t_1 uno o más patrones de localización de G_{M1} asociados con espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia de t_1 . Las imágenes de fluorescencia de t_0 se obtienen a tiempos tras la capacitación *in vitro* seleccionados de: de 0,1 horas a 5 horas; de 0,1 horas a 8 horas; de 0,1 a 12 horas; o de 0,1 horas a 18 horas (t_0); y las imágenes de fluorescencia de t_1 se obtienen a un tiempo tras la capacitación t_1 en

el que t_1 es mayor que t_0 . Se miden un número de patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA), un número de patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM) y un número total de patrones de localización de G_{M1} para los espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia de t_0 presentados en las imágenes de fluorescencia de t_0 para determinar un porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 . Y se miden un número de patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA), un número de patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM) y un número total de patrones de localización de G_{M1} para los espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia de t_1 presentados en las imágenes de fluorescencia de t_1 para determinar un porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 . Se compara el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 con el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 para determinar un tiempo de capacitación *in vivo* seleccionado de un tiempo de capacitación *in vivo* tardío de más de 12 horas o un tiempo de capacitación *in vivo* convencional de 12 horas o menos. Una diferencia en el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 y el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 correspondiente a: más de una desviación estándar con respecto a un patrón del 35% indica un tiempo de capacitación *in vivo* tardío de más de 12 horas; o menos de una desviación estándar con respecto a un patrón del 35% indica un tiempo de capacitación *in vivo* convencional de menos de 12 horas. Un porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] correspondiente a: más del 35% indica un estado de fecundidad alta; una desviación estándar por debajo del 35% indica un estado de fecundidad media; y dos o más desviaciones estándar por debajo del 35% indica un estado de fecundidad baja. Además, cuando una diferencia en el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 y el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 correspondiente a: más de una desviación estándar con respecto a un patrón del 35%, entonces se determina un estado de fecundidad de t_1 basándose en una comparación del porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 medido con el porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM]; o menos de una desviación estándar con respecto a un patrón del 35%, entonces se determina un estado de fecundidad de t_1 basándose en una comparación del porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] con el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 medido o el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 medido. Basándose en el estado de fecundidad de t_1 del macho y el tiempo de capacitación *in vivo*, se identifican un periodo de tiempo para la inseminación y un enfoque reproductor para usar con el fin de lograr la fecundación.

En el aspecto anterior de la divulgación, el macho tiene una concentración de espermatozoides al menos normal y un tiempo de capacitación *in vivo* tardío: (i) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 alta se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento del coito al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación intracervical (ICI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación intrauterina (IUI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; (ii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 media se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento de la inseminación intracervical (ICI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación intrauterina (IUI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la fecundación *in vitro* (IVF) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical; inseminación intrauterina (IUI); capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; o capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, o (iii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 baja se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento de la fecundación *in vitro* (IVF) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la transferencia intratubárica de gametos (GIFT) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación subzonal (SUZI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

En el aspecto anterior de la divulgación, el macho tiene una concentración de espermatozoides inferior a la normal y un tiempo de capacitación *in vivo* tardío: (i) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t₁ alta se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento del coito al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación intracervical (ICI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación intrauterina (IUI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical (ICI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina (IUI); (ii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t₁ media se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento de la inseminación intracervical (ICI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación intrauterina (IUI) al tiempo de capacitación *in vivo*

vivo tardío; modificar el momento de la fecundación *in vitro* (IVF) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; o capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*; o (iii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 baja se selecciona del grupo que consiste en: modificar el momento de la fecundación *in vitro* (IVF) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), modificar el momento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la transferencia intratubárica de gametos (GIFT) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío; modificar el momento de la inseminación subzonal (SUZI) al tiempo de capacitación *in vivo* tardío, capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

En el aspecto anterior de la divulgación, el macho tiene una concentración de espermatozoides al menos normal y un tiempo de capacitación *in vivo* convencional: (i) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 alta se selecciona del grupo que consiste en: coito, inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; (ii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 media se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical; inseminación intrauterina (IUI); capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; o fecundación *in vitro* (IVF) o capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*; o (iii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 baja se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia intratubárica de gametos (GIFT), capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos, inseminación subzonal (SUZI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

En el aspecto anterior de la divulgación, el macho tiene una concentración de espermatozoides inferior a la normal y un tiempo de capacitación *in vivo* convencional: (i) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 alta se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; (ii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 media se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, o (iii) el enfoque reproductor para el estado de fecundidad de t_1 baja se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia intratubárica de gametos (GIFT), capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos, inseminación subzonal (SUZI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

En cada una de las divulgaciones anteriores, la etapa de identificación también se basa en uno o más de los siguientes: datos demográficos de paciente, estado reproductor de la pareja femenina, concentración de espermatozoides, movilidad total, movilidad progresiva, volumen de semen, pH de semen, viscosidad de semen y/o morfología de espermatozoides y combinaciones de los mismos.

En cada una de las divulgaciones anteriores, los más de un patrón de localización de G_{M1} incluyen patrón de localización de G_{M1} en AA, patrón de localización de G_{M1} en APM, patrón de localización de G_{M1} en células de revestimiento, patrón de localización de G_{M1} inter., patrón de localización de G_{M1} en PAPM, patrón de localización de G_{M1} en AA/PA, patrón de localización de G_{M1} en ES y patrón de localización de G_{M1} dif.

En cada una de las divulgaciones anteriores, los espermatozoides se tratan *in vitro* con condiciones de capacitación durante un periodo de tiempo de capacitación de: al menos una hora; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; durante un periodo de tiempo de capacitación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 24 horas; 12 horas y 24 horas; o 18 horas y 24 horas.

En cada una de las divulgaciones anteriores, los espermatozoides capacitados *in vitro* se tratan con un agente de fijación durante un periodo de tiempo de fijación de: al menos 0,5 horas; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; al menos 30 horas; al menos 36 horas; o al menos 48 horas, durante un periodo de tiempo de fijación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 18 horas; 6-18 horas; 6-24 horas; 12 horas y 24 horas; 18 horas y 24 horas; 18-30 horas; 18-36 horas; 24-30 horas; 24-26 horas; 18-48 horas; 24-48 horas; o 36-48 horas.

En cada una de las divulgaciones anteriores, los espermatozoides se trataron con procedimientos de crioconservación y se almacenaron antes de tratarse *in vitro* con condiciones de capacitación.

La presente divulgación proporciona un método que identifica un enfoque para lograr la fecundación de mamíferos. Se tratan espermatozoides capacitados *in vitro* con un marcador de fluorescencia. Se generan datos que ilustran uno o más patrones de localización de G_{M1} de los espermatozoides capacitados *in vitro* tratados con marcador de fluorescencia, obteniéndose dichos datos a tiempos tras la capacitación *in vitro* seleccionados de: de 0,1 horas a 5 horas; de 0,1 horas a 8 horas; de 0,1 a 12 horas; o de 0,1 horas a 18 horas (t_0); y tiempos mayores que t_0 (t_1). Después se caracterizan datos de estado de fecundidad de un macho usando los datos de uno o más patrones de localización de G_{M1} en esos tiempos. Basándose en los datos de estado de fecundidad del macho, se identifican un periodo de tiempo para la inseminación y un enfoque reproductor para usar con el fin de lograr la fecundación. Los espermatozoides pueden crioconservarse y almacenarse antes de tratarse *in vitro* con condiciones de capacitación.

Los espermatozoides pueden tratarse *in vitro* con condiciones de capacitación durante un periodo de tiempo de capacitación de: al menos una hora; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; durante un periodo de tiempo de capacitación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 24 horas; 12 horas y 24 horas; o 18 horas y 24 horas. Las condiciones de capacitación incluyen exposición *in vitro* a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Las condiciones no de capacitación incluyen ausencia de exposición *in vitro* a cualquiera de iones bicarbonato, iones calcio y un mediador de eflujo de esterol tal como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina durante periodos de tiempo variables.

En otro caso de este tipo, los espermatozoides capacitados *in vitro* se tratan con un agente de fijación durante un periodo de tiempo de fijación de: al menos 0,5 horas; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; durante un periodo de tiempo de capacitación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 24 horas; 12 horas y 24 horas; o 18 horas y 24 horas. El agente de fijación puede ser paraformaldehído o glutaraldehído.

Los datos de estado de fecundidad del macho pueden caracterizarse comparando datos que ilustran los patrones de localización de G_{M1} de espermatozoides capacitados *in vitro* con datos de referencia que ilustran patrones de localización de G_{M1} de espermatozoides capacitados *in vitro* para machos que tienen un estado de fecundidad conocido. El número de cada patrón de localización marcado con G_{M1} se determina para un número predeterminado de los espermatozoides capacitados *in vitro*. Después se calcula una razón para una suma del número de patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA) y el número de patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM) con respecto a una suma del número total de patrones de localización marcados con G_{M1} . Después se compara la razón de patrones de localización de G_{M1} con razones de referencia de patrones de localización de G_{M1} para machos que tienen un estado de fecundidad conocido. Los más de un patrón de localización de G_{M1} corresponden a patrón de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA), patrón de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM), patrón de localización de G_{M1} en células de revestimiento, patrón de localización de G_{M1} intermedio (inter.), patrón de localización de G_{M1} en membrana plasmática post-acrosómica (PAPM), patrón de localización de G_{M1} en acrosoma apical/post-acrosoma (AA/PA), patrón de localización de G_{M1} en segmento ecuatorial (ES) y patrón de localización de G_{M1} difuso (dif.).

En otro caso de la divulgación anterior, los datos de estado de fecundidad del macho se comparan con datos de estado de fecundidad masculina conocido que está asociado con un periodo de tiempo conocido para la inseminación y asociado con un enfoque reproductor conocido. El estado de fecundidad conocido incluye: fértil con capacitación de espermatozoides dentro del plazo de 3 horas; fértil con capacitación de espermatozoides dentro del plazo de 12 horas, fértil con capacitación entre 12 y 24 horas; y no fértil.

En la divulgación anterior, el enfoque reproductor puede corresponder a enfoques de inseminación natural y enfoques de inseminación artificial tal como se conoce en la técnica. El enfoque reproductor puede incluir: coito; inseminación intracervical (ICI), inseminación intrauterina (IUI), fecundación *in vitro* (IVF), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, transferencia intratubárica de gametos (GIFT) e inseminación subzonal (SUZI).

Cuando el enfoque reproductor corresponde a coito, el periodo de tiempo para el coito se determina con respecto al momento de ovulación de la hembra, tal como se visualiza con ecografía, y/o se predice basándose en el momento del ciclo menstrual, uso de kits de sincronismo de la ovulación, cambios en la temperatura corporal o momento con respecto a una o más inyecciones con una o más hormonas diseñadas para inducir crecimiento folicular y ovulación. Por ejemplo, el periodo de tiempo de inseminación puede corresponder a: 96 horas antes del momento de la ovulación; 72 horas antes del momento de la ovulación; 48 horas antes del momento de la ovulación; 24 horas antes del momento de la ovulación; 12 horas antes del momento de la ovulación; 6 horas antes del momento de la ovulación; o en el momento de la ovulación.

Cuando el enfoque reproductor corresponde a ICI o IUI, el periodo de tiempo para la inseminación se determina

con respecto al momento de ovulación de la hembra, tal como se visualiza con ecografía, y/o se predice basándose en el momento del ciclo menstrual, uso de kits de sincronismo de la ovulación, cambios en la temperatura corporal o momento con respecto a una o más inyecciones con una o más hormonas diseñadas para inducir crecimiento folicular y ovulación. Por ejemplo, el periodo de tiempo de inseminación puede corresponder a: 96 horas antes del momento de la ovulación; 72 horas antes del momento de la ovulación; 48 horas antes del momento de la ovulación; 24 horas antes del momento de la ovulación; 12 horas antes del momento de la ovulación; 6 horas antes del momento de la ovulación; o en el momento de la ovulación.

Cuando el enfoque reproductor corresponde a IVF, el periodo de tiempo para la inseminación corresponde a 3 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; 4 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; 6 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; 12 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; 18 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; 24 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; o 30 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos.

Cuando el enfoque reproductor corresponde a capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, el periodo de tiempo para la capacitación previa corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

Cuando el enfoque reproductor corresponde a inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

Cuando el enfoque reproductor corresponde a transferencia intratubárica de gametos (GIFT), el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

Cuando el enfoque reproductor corresponde a inseminación subzonal (SUZI), el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

En algunos casos de la divulgación anterior, pueden usarse otros parámetros para identificar un periodo de tiempo para la inseminación y un enfoque reproductor. Los otros parámetros pueden incluir uno o más de los siguientes: datos demográficos de paciente, estado reproductor de la pareja femenina, concentración de espermatozoides, movilidad total, movilidad progresiva, volumen de semen, pH de semen, viscosidad de semen y/o morfología de espermatozoides y combinaciones de los mismos.

La presente divulgación también proporciona un método adicional de identificación de un enfoque para lograr la fecundación de mamíferos. Se tratan espermatozoides capacitados *in vitro* con un marcador de fluorescencia. Se obtienen una o más imágenes de fluorescencia de espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia. Se mide un valor de Cap-Score para una muestra de espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia después de tratarse los espermatozoides *in vitro* con condiciones de capacitación durante periodos de tiempo variables. Se compara el valor de Cap-Score con valores de Cap-Score de referencia asociados con machos con estado de fecundidad conocido a esos tiempos. Basándose en el valor de Cap-Score, se identifican un periodo de tiempo para la inseminación y un enfoque reproductor para usar con el fin de lograr la fecundación.

Los espermatozoides se tratan *in vitro* con condiciones de capacitación durante un periodo de tiempo de capacitación de: al menos una hora; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; durante un periodo de tiempo de capacitación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 24 horas; 12 horas y 24 horas; o 18 horas y 24 horas. Las condiciones no de capacitación incluyen ausencia de exposición *in vitro* a cualquiera de iones bicarbonato, iones calcio y un mediador de eflujo de esterol tal como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina durante periodos de tiempo variables.

Los espermatozoides capacitados *in vitro* se tratan con un agente de fijación durante un periodo de tiempo de: al menos 0,5 horas; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; al menos 30 horas; al menos 36 horas; o al menos 48 horas, durante un periodo de tiempo de fijación que oscila entre

0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 18 horas; 6-18 horas; 6-24 horas; 12 horas y 24 horas; 18 horas y 24 horas; 18-30 horas; 18-36 horas; 24-30 horas; 24-26 horas; 18-48 horas; 24-48 horas; o 36-48 horas. El agente de fijación incluye paraformaldehído o glutaraldehído.

- 5 En un caso de la divulgación anterior, el valor de Cap-Score se compara con valores de Cap-Score de referencia para un estado de fecundidad masculina conocido que está asociado con un periodo de tiempo conocido para la inseminación y asociado con un enfoque reproductor conocido. En tales casos, el estado de fecundidad conocido incluye: fértil con capacitación de espermatozoides dentro del plazo de 3 horas; fértil con capacitación de espermatozoides dentro del plazo de 12 horas, fértil con capacitación entre 12 y 24 horas; y no fértil.

- 10 En casos de la divulgación anterior, valor de Cap-Score corresponde a una razón para una suma de un número de patrones de localización de G_{M1} en AA y un número de patrones de localización de G_{M1} en APM con respecto a una suma de un número total de patrones de localización marcados con G_{M1} , cada uno determinado para la muestra de espermatozoides capacitados *in vitro*. El uno o más patrones de localización marcados con G_{M1} comprenden patrón de localización de G_{M1} en AA, patrón de localización de G_{M1} en APM, patrón de localización de G_{M1} en células de revestimiento, patrón de localización de G_{M1} inter., patrón de localización de G_{M1} en PAMP, patrón de localización de G_{M1} en AA/PA, patrón de localización de G_{M1} en ES y patrón de localización de G_{M1} dif.

- 20 El enfoque reproductor puede corresponder a enfoques de inseminación natural y enfoques de inseminación artificial tal como se conoce en la técnica. El enfoque reproductor incluye: coito; inseminación intracervical (ICI), inseminación intrauterina (IUI), fecundación *in vitro* (IVF), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, transferencia intratubárica de gametos (GIFT) e inseminación subzonal (SUZI).

- 25 Cuando el enfoque reproductor corresponde a coito, el periodo de tiempo para el coito se determina con respecto al momento de ovulación de la hembra, tal como se visualiza con ecografía, y/o se predice basándose en el momento del ciclo menstrual, uso de kits de sincronismo de la ovulación, cambios en la temperatura corporal o momento con respecto a una o más inyecciones con una o más hormonas diseñadas para inducir crecimiento folicular y ovulación. Por ejemplo, el periodo de tiempo de inseminación puede corresponder a: 96 horas antes del momento de la ovulación; 72 horas antes del momento de la ovulación; 48 horas antes del momento de la ovulación; 24 horas antes del momento de la ovulación; 12 horas antes del momento de la ovulación; 6 horas antes del momento de la ovulación; o en el momento de la ovulación.

- 35 Cuando el enfoque reproductor corresponde a ICI o IUI, el periodo de tiempo para la inseminación se determina con respecto al momento de ovulación de la hembra, tal como se visualiza con ecografía, y/o se predice basándose en el momento del ciclo menstrual, uso de kits de sincronismo de la ovulación, cambios en la temperatura corporal o momento con respecto a una o más inyecciones con una o más hormonas diseñadas para inducir crecimiento folicular y ovulación. Por ejemplo, el periodo de tiempo de inseminación puede corresponder a: 96 horas antes del momento de la ovulación; 72 horas antes del momento de la ovulación; 48 horas antes del momento de la ovulación; 24 horas antes del momento de la ovulación; 12 horas antes del momento de la ovulación; 6 horas antes del momento de la ovulación; o en el momento de la ovulación.

- 45 Cuando el enfoque reproductor corresponde a IVF, el periodo de tiempo para la inseminación corresponde a 3 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; 4 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; 6 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; 12 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; 18 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; 24 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos; o 30 horas antes de la determinación de formación de pronúcleos.

- 50 Cuando el enfoque reproductor corresponde a la capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, el periodo de tiempo para la capacitación previa corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

- 60 Cuando el enfoque reproductor corresponde a inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

- 65 Cuando el enfoque reproductor corresponde a transferencia intratubárica de gametos ("GIFT"), el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación;

18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

Cuando el enfoque reproductor corresponde a inseminación subzonal (SUZI), el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

La presente divulgación también proporciona un método de identificación de un mecanismo apropiado para lograr un embarazo de mamífero satisfactorio. Se tratan espermatozoides capacitados *in vitro* con un marcador de fluorescencia. Se obtienen una o más imágenes de fluorescencia de espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia. Se mide un valor de Cap-Score para una muestra de espermatozoides capacitados *in vitro* marcados con fluorescencia después de tratarse los espermatozoides *in vitro* con condiciones de capacitación durante periodos de tiempo variables. Se compara el valor de Cap-Score con un valor de Cap-Score de referencia asociado con machos fértiles. Se determina un mecanismo apropiado para lograr un embarazo satisfactorio basándose en el valor de Cap-Score. La determinación también se basa en uno o más de los siguientes: datos demográficos de paciente, estado reproductor de la pareja femenina, concentración de espermatozoides, movilidad total, movilidad progresiva, volumen de semen, pH de semen, viscosidad de semen y/o morfología de espermatozoides.

En una realización, se procesa una muestra de semen usando una pipeta de orificio ancho que tiene un orificio de tamaño suficiente en diámetro como para prevenir el corte de una membrana de espermatozoide y se procesa la muestra de semen sin usar un reactivo que pueda dañar las membranas de espermatozoides. En una realización de este tipo, la muestra de semen procesada se expone a medios de capacitación, agente de fijación y reactivos para determinar patrones de localización de G_{M1} .

En una realización, un reactivo que puede dañar las membranas de espermatozoides se selecciona del grupo que consiste en: (i) una proteasa; (ii) una nucleasa; (iii) un agente mucolítico; (iv) una lipasa; (v) una esterasa y (vi) glicósido hidrolasas. Los ejemplos de compuestos que pueden interferir de manera similar con la capacidad de los espermatozoides para responder a estímulos de capacitación incluyen: (i) una proteasa, incluyendo, pero sin limitarse a, quimotripsina, tripsina, collagenasa, bromelaina; (ii) una nucleasa, incluyendo, pero sin limitarse a, dornasa, HindIII, EcoRI; (iii) un agente mucolítico, incluyendo, pero sin limitarse a, erdosteína, acetilcisteína, guaifenesina; (iv) una lipasa, incluyendo, pero sin limitarse a, fosfolipasa A1, fosfolipasa C, lipoproteína lipasa; (v) una esterasa, incluyendo, pero sin limitarse a, colinesterasa, tioesterasa, fosfatasa alcalina; y (vi) glicósido hidrolasas, incluyendo, pero sin limitarse a, alfa-amilasa, beta-galactosidasa, hialuronidasa, neuorminodasas y lisozima.

En casos de la divulgación anterior, se determina el tamaño de población para uno o más patrones de localización marcados con G_{M1} , de tal manera que se minimiza el cambio en porcentaje alrededor del valor de Cap-Score dentro de un individuo. El uno o más patrones de localización marcados con G_{M1} comprenden patrón de localización de G_{M1} en AA, patrón de localización de G_{M1} en APM, patrón de localización de G_{M1} en células de revestimiento, patrón de localización de G_{M1} intermedio (inter.), patrón de localización de G_{M1} en membrana plasmática post-acrosómica (PAPM), patrón de localización de G_{M1} en acrosoma apical/post-acrosoma (AA/PA), patrón de localización de G_{M1} en segmento ecuatorial (ES) y patrón de localización de G_{M1} difuso (dif.).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen y demuestran adicionalmente realizaciones ilustrativas de la presente invención y casos de la divulgación.

Ejemplo 1

Métodos de manipulación de espermatozoides

Se evaluaron tres métodos habituales para reducir la viscosidad. Los eyaculados: 1) se incubaron durante 0,25, 1,25 ó 2 horas, 2) se diluyeron 1:1 con líquido tubárico humano modificado (Irvine Scientific; Santa Anna, CA) y después se hicieron pasar a través de una pipeta de transferencia de orificio ancho ("WOTP") o una pipeta Pasteur ("PP"), 3) se sometieron a digestión enzimática con quimotripsina ("quimo"). Estudios piloto revelaron que el pase a través de una aguja hipodérmica afectaba de manera negativa a la movilidad y la integridad de membrana y no se estudió adicionalmente. Tras la licuación, se lavaron las muestras y se incubaron en condiciones de capacitación (CAP) y no de capacitación (NC). Se obtuvieron valores de Cap-Score mediante microscopía de fluorescencia según el cálculo descrito anteriormente.

Fiabilidad y reproducibilidad de valores de Cap-Score™

Tras la licuación de muestras de semen a partir de hombres que dieron su consentimiento, se lavaron los espermatozoides, se incubaron, se fijaron y después se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia para determinar patrones de localización de G_{M1} . Se evaluaron tanto la precisión de puntuación dentro de una muestra como la variación entre evaluadores que puntuaron las mismas muestras. Se realizó una prueba de la t de Student empleando una varianza diferente usando Microsoft Excel (2013).

Correlación del valor de Cap-Score con parámetros de análisis de semen tradicionales

Se licuaron muestras de semen a partir de pacientes que dieron su consentimiento, se lavaron y se incubaron en condiciones tanto no de capacitación como de capacitación. Se realizó un análisis de semen según directrices de la OMS. Se obtuvieron valores de Cap-Score mediante microscopía de fluorescencia. Se realizaron análisis estadísticos usando Microsoft Excel (2013) y XLSTAT (2015).

Evaluación de la capacitación usando valores de Cap-Score™ para machos de fecundidad demostrada en comparación con machos que estaban evaluándose para determinar la fecundidad

Se determinaron los valores de Cap-Score en hombres que dieron su consentimiento a partir de dos cohortes: 1) fecundidad conocida (pareja embarazada o padre de un hijo de menos de 3 años de edad) y 2) pacientes que se sometían a su primer análisis de semen. Tras la licuación, se lavaron los espermatozoides y se incubaron 3 millones durante 3 horas en condiciones no de capacitación (NC) y de capacitación (CAP). Se fijaron los espermatozoides durante la noche y se evaluaron los patrones de localización de G_{M1} mediante microscopía de fluorescencia.

Resultados

El tiempo de licuación, la dilución y la transferencia con pipeta no alteraron los valores de Cap-Score. Las muestras de control (sólo incubación), tratadas con WOTP y con PP tenían valores de Cap-Score de 41 ± 4 , 40 ± 5 y 41 ± 6 ($n=5$; CAP). Se observó una disminución en la respuesta a estímulos de capacitación cuando se licuaron muestras usando quimo ($P=0,03$). Las muestras de control tenían valores de Cap-Score de 40 ± 6 ($n=5$; CAP) mientras que las muestras licuadas enzimáticamente tenían valores de Cap-Score de 31 ± 4 ($n=5$; CAP). Dado que quimo es una proteasa que puede cortar proteínas de membrana, se examinó para determinar si el valor de Cap-Score reducido resultaba a partir de una alteración en el marcaje. Se compararon muestras no expuestas a estímulos de capacitación y no se observó ninguna diferencia. Las muestras de control y licuadas enzimáticamente tenían valores de Cap-Score de 22 ± 4 y 21 ± 5 ($n=5$; NC). Estos datos respaldan la opinión de que tratar semen con quimo, aunque se usa ampliamente en la práctica clínica, puede inhibir la capacidad de los espermatozoides para responder a estímulos de capacitación.

Las clases de compuestos que pueden interferir de manera similar con la capacidad de los espermatozoides para responder a estímulos de capacitación incluyen: (i) una proteasa, incluyendo, pero sin limitarse a, quimotripsina, tripsina, collagenasa, bromelaina; (ii) una nucleasa, incluyendo, pero sin limitarse a, dornasa, HindIII, EcoRI; (iii) un agente mucolítico, incluyendo, pero sin limitarse a, erdosteína, acetilcisteína, guaifenesina; (iv) una lipasa, incluyendo, pero sin limitarse a, fosfolipasa A1, fosfolipasa C, lipoproteína lipasa; (v) una esterasa, incluyendo, pero sin limitarse a, colinesterasa, tioesterasa, fosfatasa alcalina; y (vi) glicósido hidrolasas, incluyendo, pero sin limitarse a, alfa-amilasa, beta-galactosidasa, hialuronidasa, neuorminodasas y lisozima.

Los tiempos de licuación de hasta 2 horas y la licuación mecánica usando WOTP y/o PP no influyeron en la capacitación. En cambio, el uso de enzimas tales como quimo redujo la capacidad de los espermatozoides para experimentar capacitación, tal como se mide mediante la prueba Cap-Score™. Estos resultados demuestran la importancia de conocer cómo afectan los métodos de procesamiento de semen a la función de los espermatozoides.

Se evaluó la precisión comparando el cambio en porcentaje alrededor de valores de Cap-Score ($\% \Delta = (y_2 - y_1) / y_2$) cuando se evaluaron 50, 100, 150 y 200 espermatozoides. Se observaron cambios en valores del 11, 6 y 5% para cada adición de 50 espermatozoides ($n \geq 23$). De manera conservativa, se determinó el valor de Cap-Score contando los patrones de localización de G_{M1} de al menos 150 células. Para evaluar la variación dentro de, y entre, evaluadores, se generaron 8 archivos de imágenes grandes que contenían hasta 5.000 espermatozoides combinando imágenes tomadas a partir de múltiples campos visuales. Se dio formación a dos evaluadores diferentes y determinaron valores de Cap-Score remuestreando aleatoriamente cada imagen 20 veces, contando 150 células cada vez. Cuando se puntuó la misma muestra, los evaluadores individuales notificaron una DE promedio de tres (3) unidades de Cap-Score. La diferencia entre evaluadores cuando se puntuó la misma muestra osciló entre 0,00 y 1,52, con una diferencia promedio de uno (1) entre los evaluadores para cualquier muestra dada. Aplicando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, no se observó ninguna diferencia entre evaluadores para ningún archivo de imágenes (los valores de p oscilaron entre 0,02 y 0,99).

El valor de Cap-Score no se vio afectado por el tiempo de licuación ni la licuación mecánica con WOTP o PP ($n=5$), aunque, después del lavado y la incubación, las muestras que se habían sometido a dos (2) horas de

licuación o pase a través de una PP mostraron una mayor disminución de la movilidad ($p=0,02$, $3E-3$). El uso de una aguja dañó a los espermatozoides y no se investigó adicionalmente. La licuación con quimo redujo los valores de Cap-Score en muestras de CAP ($p=0,03$), pero no de NC ($p=0,74$). No pudieron puntuarse las muestras incubadas con quimo ($n=5$; 3 mg/ml) debido al daño de la membrana, pero mostraron un aumento de la movilidad en condiciones NC ($p=9E-4$).

Ejemplo 2

Este ejemplo se llevó a cabo usando una comparación de cohortes entre hombres fértiles (cohorte 1, pareja embarazada o padre reciente) y posiblemente de fecundidad insuficiente/estériles (cohorte 2, hombres que se cuestionaban la fecundidad). También se exploraron relaciones entre el valor de Cap-Score y medidas de semen tradicionales.

Todos los estudios los aprobó WIRB (20152233). Se licuaron muestras de semen, se lavaron y se incubaron en condiciones no de capacitación y de capacitación. Se fijaron espermatozoides durante la noche y se determinaron valores de Cap-Score mediante microscopía de fluorescencia. Se evaluaron medidas de calidad de semen según la OMS. Se realizaron análisis mediante prueba de la t, ANOVA y correlación usando Microsoft Excel (2013) y XLSTAT.

El valor de Cap-Score medio para la cohorte 1 fue de 35,3 ($DE=7,7\%$; $n=76$ donantes; 187 recogidas). Los valores de Cap-Score fueron inferiores para la cohorte 2 ($p=1,0E-03$), teniendo el 33,6% (41/122) valores de Cap-Score por debajo de una (1) DE por debajo de la media para la cohorte 1, frente al 16% previsto. Para la cohorte 2, no se observó ninguna relación entre el valor de Cap-Score y la morfología ($p=0,28$), movilidad ($p=0,14$) o concentración ($p=0,67$). El 93,4% (114/122) de los hombres en la cohorte 2 mostraron una movilidad normal, pero el 30,7% (35/114) de ellos tenían valores de Cap-Score por debajo de una (1) DE por debajo de la media. De manera similar, 101 de 122 hombres (82,7%) mostraron una concentración normal, teniendo el 32,6% (33/101) valores de Cap-Score por debajo de una (1) DE por debajo de la media. Estos resultados muestran que los defectos de capacitación son comunes en hombres que tienen dificultades para concebir y el valor de Cap-Score proporciona datos funcionales que complementan el análisis de semen.

La capacidad de los espermatozoides para experimentar capacitación difiere entre hombres fértiles y aquellos que tienen problemas para concebir. Dado que se requiere capacitación para la fecundación, el valor de Cap-Score puede proporcionar un complemento funcional importante para el análisis de semen convencional y puede ayudar a elegir el tratamiento de fecundidad más apropiado.

Las medidas habituales de la calidad de semen son subjetivas y pueden variar dentro de, y entre, evaluadores, haciendo que la evaluación de la fecundidad masculina resulte difícil. La prueba Cap-Score™ evalúa la capacidad de los espermatozoides para experimentar capacitación, una necesidad para la fecundidad masculina. Los datos presentados en este caso muestran que la prueba Cap-Score™ es altamente reproducible y fiable dentro de, y entre, evaluadores, lo cual son consideraciones clave cuando se intenta diagnosticar esterilidad masculina.

Se usó la media de Cap-Score ($\mu=39$) y DE ($\sigma=7$) a partir de 41 hombres fértiles para estimar el número de hombres fértiles conocidos necesarios para establecer un perfil de capacitación fértil robusto. Para un análisis de poder, se estableció un intervalo aceptable alrededor de la media al 3% y se aplicó una prueba de la t bilateral al nivel de $p<0,01$, con una probabilidad de detectar una diferencia así de grande del 90%. Los resultados sugirieron que puede establecerse un patrón válido con ≥ 85 individuos. Se creó un patrón fértil normal preliminar usando 125 observaciones a partir de 41 donantes únicos. Se calculó el promedio de los valores de Cap-Score por donante y después se convirtió en puntuaciones de z ($(X-\mu)/\sigma$; X =observación, $\mu=39$; $\sigma=7$). Esto transformó μ a 0 y σ a 1, representando los valores convertidos la distancia desde la μ (media) en unidades de σ (D.E.). Se sometió a prueba el patrón fértil normal frente a valores de Cap-Score a partir de 93 hombres que se sometían a exámenes de fecundidad. Esta cohorte presentó una puntuación significativamente inferior a la población fértil ($p=1,6E-5$), teniendo el 27 y el 38% puntuaciones de z ≤ -2 y entre -1 y -2. Tan sólo el 35% presentaron una puntuación próxima o por encima de la media. Estos datos sugieren que, en comparación con hombres fértiles, muchos hombres que se someten a exámenes de fecundidad tienen defectos en la capacitación.

Ejemplo 3

En el ejemplo 3 se usaron los procedimientos usados en los ejemplos 1 y 2.

Los análisis de semen clásicos proporcionan poca información sobre la capacidad de muestras para fecundar un óvulo. Se requiere capacitación para la fecundación y puede evaluarse usando la localización de G_{M1} . Una comparación de los valores de Cap-Score a partir de dos cohortes de hombres reveló diferencias significativas en su capacidad para experimentar capacitación. Puede definirse un perfil de capacitación robusto y emplearse para identificar anomalías. De manera notable, el 33% de los hombres que cuestionaban su fecundidad tenían puntuaciones de z ≤ -1 , frente a un resultado esperado del 16%. Combinar la prueba Cap-Score™ con análisis

tradicionales debe resultar valioso para diagnosticar la esterilidad masculina.

Se analizaron muestras de 122 hombres derivados a un especialista en esterilidad y tenían valores de Cap-Score que oscilaban entre el 13 y el 52%. Se realizó un análisis de la varianza para comparar valores de Cap-Score y morfología de espermatozoides. Se clasificaron las muestras como que tenían el 0, 1, 2, 3 o $\geq 4\%$ de formas normales (se consideró que las puntuaciones de $\geq 4\%$ eran normales, OMS) y se compararon los valores de Cap-Score medios entre los grupos. No se observó ninguna relación entre el valor de Cap-Score y la morfología ($P=0,67$). A continuación, se comparó la concentración de espermatozoides (intervalo de 3×10^6 a $210 \times 10^6/\text{ml}$) con el valor de Cap-Score usando el coeficiente de correlación de producto-momento de Pearson y no se encontró ninguna conexión ($r=0,01$, $P=0,90$). Por último, se comparó el valor de Cap-Score con el % de movilidad total (intervalo del 15 al 80%) y se determinó que las dos medidas eran independientes ($r=0,14$, $P=0,21$). Múltiples donantes que se clasificaron como normales mediante criterios de la OMS tenían valores de Cap-Score más de dos (2) DE por debajo de la media normal, respaldando la opinión de que incluso los espermatozoides que parecen normales pueden tener anomalías funcionales.

El análisis de semen tradicional sólo identifica el 50% de los casos de esterilidad masculina. Este estudio muestra que hay poca relación entre el valor de Cap-Score y los parámetros de análisis de semen convencional. Dado que la capacitación es necesaria para la fecundación, la adición de la prueba Cap-Score a evaluaciones de semen tradicionales puede tanto identificar casos de esterilidad idiopática como ayudar a los médicos a aconsejar a las parejas sobre el tratamiento más apropiado.

Los datos presentados en el presente documento demuestran que el valor de Cap-Score de un macho puede proporcionar una orientación sobre un mecanismo apropiado para lograr embarazos de mamífero satisfactorios, incluyendo tecnología de reproducción asistida recomendada tal como fecundación *in vitro* (IVF) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). El macho puede ser un ser humano o un mamífero no humano. Puede considerarse el valor de Cap-Score en combinación con otros componentes de un análisis de semen, incluyendo concentración, movilidad total, movilidad progresiva, volumen, pH, viscosidad y/o morfología. Por ejemplo, la tecnología de reproducción asistida recomendada para dos machos con el mismo valor de Cap-Score puede diferir si sus números de espermatozoides o movilidad de espermatozoides difieren. Además, el médico también tendrá en cuenta el estado de fecundidad o la salud reproductiva de la pareja femenina.

Ejemplo 4

Se licuaron muestras de semen a partir de hombres que dieron su consentimiento, se lavaron y se incubaron alícuotas en condiciones no de capacitación (NC) o de capacitación (CAP). Los hombres que dieron su consentimiento incluyeron hombres que se clasificaron como fértiles basándose en una pareja embarazada o haber sido el macho un padre biológico reciente. Los hombres que dieron su consentimiento también incluyeron hombres que se sometían a exámenes de fecundidad. Las condiciones de capacitación incluyen exposición *in vitro* a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Las condiciones no de capacitación incluyen ausencia de exposición *in vitro* a cualquiera de iones bicarbonato, iones calcio y un mediador de eflujo de esterol tal como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina durante periodos de tiempo variables. Después se fijaron los espermatozoides capacitados *in vitro* y los espermatozoides no capacitados *in vitro* en un agente de fijación tal como paraformaldehído o glutaraldehído. Después se marcaron los espermatozoides capacitados *in vitro* y los espermatozoides no capacitados *in vitro* fijados con una subunidad de toxina del cólera b marcada con fluorescencia.

Para un conjunto de datos, se incubaron las muestras de espermatozoides en condiciones de capacitación o no de capacitación durante tres (3) horas, se fijaron, se marcaron y después se analizaron ("día 0"). Para un segundo conjunto de datos, se incubaron las muestras de espermatozoides en condiciones de capacitación o no de capacitación durante tres (3) horas, se fijaron durante la noche, se marcaron y después se analizaron ("día 1"). Para un tercer conjunto de datos, se incubaron las muestras de espermatozoides en condiciones de capacitación o no de capacitación durante tres (3) horas, se fijaron, se marcaron y después se analizaron. Para un tercer conjunto de datos, se incubaron las muestras de espermatozoides en condiciones de capacitación o no de capacitación durante 24 horas, se fijaron, se marcaron y después se analizaron ("24 h de cap."). Se evaluó la capacitación de espermatozoides usando localización de G_{M1} (Cap-Score™).

Se evaluaron 102 muestras de espermatozoides a partir de 36 hombres fértiles en el día 0 y el día 1. Entre el día 0 y el día 1, se observó un aumento del valor de Cap-Score en el 81% (83/102) de las muestras de espermatozoides, teniendo el 44% de las muestras de espermatozoides (45/102) un aumento del valor de Cap-Score de más de una (1) desviación estándar (7%).

Se evaluaron muestras de espermatozoides a partir de 17 hombres que buscaban tratamiento de fecundidad en el día 0 y el día 1. Entre el día 0 y el día 1, se observó un aumento del valor de Cap-Score en el 29% (5/17) en los que los valores de Cap-Score aumentaron más de una (1) desviación estándar (7%).

Para determinar si este cambio del valor de Cap-Score era fisiológico o era un artefacto por estar en agente de fijación durante la noche, se analizaron muestras de semen a partir de nueve (9) hombres fértiles en el día 0, el

día 1 y tras 24 horas de incubación *in vitro* en medio de capacitación o no de capacitación y después se fijaron. Todas las muestras no capacitadas *in vitro* fueron equivalentes (valores de Cap-Score del 19 ± 2 , 23 ± 2 y $20\pm 1\%$) y fueron diferentes de las muestras capacitadas *in vitro* (valores de Cap-Score del 28 ± 1 , 34 ± 2 y $31\pm 2\%$, respectivamente). Los valores de Cap-Score en el día 1 fueron significativamente mayores que los valores de Cap-Score para el día 0 ($p=0,03$). Sin embargo, los valores de Cap-Score para muestras capacitadas *in vitro* incubadas durante la noche en el agente de fijación (día 1) o en medio de capacitación (24 h de cap.) fueron los mismos ($p=0,33$).

De manera compatible con la bibliografía anterior, estos datos muestran que todavía se producen cambios en la membrana de espermatozoides que participan en la capacitación a lo largo del tiempo en determinados agentes de fijación. Estos datos sugieren que los espermatozoides alcanzan la capacitación a tiempos diferentes en diferentes eyaculados. Para ver si esto era reproducible para un individuo, se clasificaron 91 muestras a partir de 25 hombres fértiles como de capacitación temprana o tardía (día 1-día 0>7). La concordancia promedio de cambio dentro de donantes fue del 76%, mostrando que el momento de la capacitación era altamente sistemático dentro de los hombres.

Ejemplo 5

Se usaron muestras de semen a partir de 8 hombres fértiles (pareja embarazada o padre reciente) para examinar el efecto de la crioconservación sobre el momento de la capacitación. Se dividieron eyaculados licuados; la mitad se procesaron inmediatamente (reciente) y los demás se crioconservaron en tampón de yema de prueba con glicerol (Irvine Scientific). Posteriormente se descongelaron muestras crioconservadas y se procesaron (CryoT). Se lavaron alícuotas recientes y CryoT y después se incubaron en condiciones no de capacitación (NC) y de capacitación (CAP) durante 3 horas. El momento de capacitación difiere entre hombres y puede evaluarse comparando diferencias del valor de Cap-Score desde el día 1 (tras la incubación durante la noche en condiciones que fomentan/permiten la capacitación) hasta el día 0 (analizado tras 3 horas de incubación).

El valor de Cap-Score aumentó en tratamientos NC CryoT tanto para el día 0 como para el día 1 en comparación con los recientes. Para el día 0 hubo un aumento del 155% ((reciente - CryoT)/reciente; el $11\pm 1,6\%$ frente al $28\pm 2,4\%$; $n=7$; $p=0,00$) y un aumento del 79% para el día 1 (el $19\pm 2,6\%$ frente al $34\pm 2,7\%$; $n=8$; $p=0,00$). A la inversa, el valor de Cap-Score para tratamientos CAP permaneció igual tanto para el día 0 (el $26\pm 3,1\%$ frente al $30\pm 2,5\%$; $n=7$; $p=0,31$) como para el día 1 (el $34\pm 2,9\%$ frente al $34\pm 1,7\%$; $n=8$; $p=0,86$). Movilidades promedio tras la descongelación y tras el lavado del $27\pm 3,5\%$ y el $31\pm 8,6\%$ para muestras CryoT sugieren una viabilidad tras la descongelación razonable. Cuando se compararon muestras para el día 0 y el día 1, no se observó ninguna diferencia en el momento de capacitación (día 1 - día 0; $n=7$) entre muestras recientes y CryoT para tratamientos NC (el $10\pm 2,2\%$ frente al $8\pm 2,7\%$) o CAP (el $8\pm 3,8\%$ frente al $5\pm 2,3\%$).

Ejemplo 6

Todos los procedimientos, para la recogida de muestras, los aprobó WIRB (protocolo n.º 20152233). Se recogieron muestras de semen a partir de hombres que dieron su consentimiento mediante masturbación manual tras un mínimo de 2 y un máximo de 5 días de abstinencia sexual. Las muestras que tenían menos de 10×10^6 espermatozoides móviles se descartaron de este estudio.

Se licuaron los eyaculados a 37°C durante al menos 15 minutos y durante no más de dos (2) horas. Tras la licuación, se extrajeron los espermatozoides a partir del plasma seminal mediante centrifugación a través de medios de aislamiento de células Enhance S-Plus (Vitrolife, referencia: 15232 ESP-100-90%) a $300\times g$ durante 10 minutos. Se recogieron las células, se resuspendieron en ~ 4 ml de medio de líquido tubárico humano modificado (mHTF; Irvine Scientific; referencia 90126) y se sedimentaron a $600\times g$ durante 10 minutos. Se resuspendieron los espermatozoides en mHTF con y sin estímulos de capacitación y se incubaron durante tres (3) horas. Tras la incubación, se fijaron las muestras tal como se describe (Selvaraj V, *et al.*, "Segregation of micron-scale membrane sub-domains in live murine sperm", J Cell Physiol. 206: 636-46 (2006)) con paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, PA) durante al menos 30 minutos antes del marcaje.

Se marcaron las muestras con $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ de toxina del cólera B, conjugada con Alexa Fluor 488 (CTB; Thermo Fisher: C34775). Tras diez minutos, se colocaron $5\text{ }\mu\text{l}$ de los espermatozoides marcados en un portaobjetos de microscopio, se recubrieron con un cubreobjetos y se llevaron a una estación de obtención de imágenes.

Las estaciones de obtención de imágenes consistían en microscopios Nikon Eclipse NI-E equipados con: objetivos CFI60 Plan Apochromat Lambda 40x, conjuntos de filtro de paso largo C-FL AT GFP/FITC, cámaras Hamamatsu ORCA-Flash 4.0, platinas de microscopio de parte superior plana H101F motorizadas verticales con armazón abierto H101F - ProScan III, y estaciones de trabajo de obtención de imágenes de 64 bits que ejecutaban el software NIS Elements (Nikon; Melville, NY). Estos sistemas estaban programados para captar automáticamente conjuntos de 15×15 imágenes ensambladas que contenían hasta 5.000 espermatozoides.

La SFT Cap-Score detecta y analiza patrones de localización del gangliósido GM_1 . Se dio formación a dos

evaluadores independientes para identificar patrones de localización de G_{M1} que se habían asociado con capacitación de espermatozoides humanos. Se determinó la proporción de espermatozoides dentro de una muestra que habían experimentado capacitación y se notificó como valor de Cap-Score.

- 5 Se realizó un análisis de poder usando G*power (Faul *et al.*, “G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences”, Behav Res Methods. 39: 175-91 (2007)). Se realizó la prueba de la t de Student usando Microsoft Excel (2013). Se llevaron a cabo regresión lineal y prueba de Bartlett de homocedasticidad en XLSTAT versión 2015.5.01.22912.

10 Resultados

La primera etapa en la determinación de la precisión de Cap-Score fue definir el número de células a contar por muestra. En general, a medida que aumenta el número de células contadas, hay un aumento de la precisión. Sin embargo, en algún punto contar células adicionales se vuelve redundante, dado que el valor de Cap-Score no cambiará con observaciones adicionales. Para identificar el punto en el que contar células adicionales es innecesario, se evaluó el cambio en porcentaje alrededor del valor de Cap-Score con 50, 100, 150 y 200 espermatozoides (tabla 1).

Tabla 1: cambio en porcentaje del valor de Cap-Score con el aumento del número de espermatozoides contados.

N.º de espermatozoides contados	% de Δ media	Desv. est.	N.º de obs.	EEM	IC del 95%	
					LL	UL
desde 50 hasta 100	11%	9%	23	2%	7%	14%
desde 100 hasta 150	6%	5%	26	1%	4%	8%
desde 150 hasta 200	5%	3%	26	1%	4%	6%

El cambio en porcentaje del valor de Cap-Score cuando se contaron 50 ó 100 espermatozoides fue grande en comparación con el cambio en porcentaje cuando se contaron 100 ó 150 y 150 ó 200 espermatozoides. Estas observaciones respaldan la opinión de que la precisión de Cap-Score sólo mejoraba moderadamente al contar más de 100 espermatozoides. Sin embargo, los intervalos de confianza del 95% para el cambio en porcentaje cuando se contaban 50 ó 100 y 150 ó 200 no se solaparon, lo que sugiere una reducción significativa del cambio en porcentaje cuando se cuentan al menos 150 células. De manera conservativa, se determinó el valor de Cap-Score contando los patrones de localización de G_{M1} de al menos 150 células.

Para explorar adicionalmente la fiabilidad de Cap-Score y evaluar su potencial como medida objetiva de la calidad de semen, se investigó su medición para determinar su exactitud dentro de evaluadores individuales. La exactitud se define como la proximidad de las mediciones al valor verdadero. El valor verdadero de una población desconocida puede estimarse mediante su tendencia central o la media. Puede evaluarse si un conjunto de datos tiene una tendencia central fuerte o débil basándose en su dispersión o la inversa de la precisión (JCGM/WG2 2008). Es decir, a medida que la dispersión aumenta, hay una disminución de la precisión. La desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CoV) miden la cantidad de dispersión dentro de una muestra. Una desviación estándar próxima a cero (0) indica que los puntos de datos tienden a agruparse estrechamente alrededor de la media, mientras que una desviación estándar alta indica que los puntos de datos están esparcidos. De manera similar, el CoV representa la cantidad de dispersión con respecto a la media ($CoV=DE/media$) y es útil para comparar el grado de variación de una serie de datos a otra, aunque las medias sean drásticamente diferentes una de otra.

Antes de evaluar la exactitud de Cap-Score dentro de evaluadores, se estimó el número de imágenes para que muestreara cada evaluador. Para ello, se definieron dos grupos de donantes de semen basándose en un punto de corte de una (1) DE por debajo del valor de Cap-Score medio para una población de hombres con supuesta fecundidad (mujer embarazada o hijo de menos de 3 años de edad). El valor de Cap-Score medio para el grupo con “valores de Cap-Score inferiores” fue de 27 y para el grupo “supuestamente fértil” fue de 40. Las desviaciones estándar para cada grupo fueron de 5,2 y 4,9 respectivamente. Se realizó un análisis de poder usando una prueba bilateral al nivel de $p<0,05$ y $p<0,01$, con una probabilidad de detectar una diferencia así de grande, si existe, del 90% ($1-\beta=0,90$). Los resultados de estos análisis indicaron que deben muestrearse 10 y 14 imágenes de muestra respectivamente (5 y 7 por grupo). De manera conservativa, se generaron 10 imágenes en cada uno de los grupos de “valor de Cap-Score inferior” y “supuestamente fértil”. Muestrear este número de imágenes por grupo garantizó que cada uno de ellos se interrogó suficientemente como para identificar cualquier diferencia en la reproducibilidad que pueda producirse debido a valores de Cap-Score bajos o altos.

Para evaluar la exactitud de la SFT Cap-Score, dos evaluadores diferentes determinaron el valor de Cap-Score remuestreando aleatoriamente 10 imágenes, que contenían hasta 5.000 espermatozoides cada una, a partir de los grupos de “valor de Cap-Score inferior” y “supuestamente fértil” y se remuestrearon 20 veces por cada evaluador. Se calcularon la DE y el CoV en cada imagen para cada evaluador. La DE promedio a lo largo de las imágenes y los evaluadores fue de 3 (figura 1A) y el CoV promedio fue del 13% (figura 1B). Tanto la DE como el

CoV mostraron una relación lineal con el valor de Cap-Score. Por tanto, aunque hubo una mayor dispersión asociada con la evaluación de valores de Cap-Score superiores, eso pareció resultar de una mayor magnitud de Cap-Score. Estos datos eran compatibles con un alto grado de exactitud, porque cuando se remuestreó aleatoriamente la misma población de espermatozoides por el mismo evaluador u otro diferente, los valores de Cap-Score se agruparon estrechamente alrededor del mismo valor verdadero. Dado que estas medidas de varianza y (o) dispersión son pequeñas y estables, revelan un alto grado de reproducibilidad de Cap-Score dentro de evaluadores.

En general, puede describirse una distribución usando su media y varianza. La media indica la ubicación de la distribución, mientras que la varianza describe lo dispersados que están los datos. Pueden imaginarse dos distribuciones en las que las medias son las mismas, pero las varianzas son diferentes. Por ejemplo, una distribución puede asemejarse a una forma de campana normal, mientras que la otra es más plana teniendo más valores de extremo. Para demostrar distribuciones de Cap-Score similares entre evaluadores, se obtuvieron 10 imágenes ensambladas para cada uno de los grupos de “valor de Cap-Score inferior” y “supuestamente fértil”. Dos evaluadores diferentes determinaron valores de Cap-Score remuestreando aleatoriamente cada imagen 20 veces. Dado que cada archivo de imágenes contenía varias magnitudes más de espermatozoides de los que se estaban muestreando, cada remuestreo aleatorio representó una submuestra distinta de células a partir de un eyaculado individual.

Se observó una diferencia promedio de uno (1) en el valor de Cap-Score medio entre los evaluadores para las 20 imágenes diferentes (figura 3). Cuando se aplicó la corrección de Bonferroni, no se observó ninguna diferencia apreciable. De manera similar, las varianzas de Cap-Score no fueron diferentes entre evaluadores (figura 3). Estos datos respaldan la opinión de que el valor de Cap-Score era reproducible entre evaluadores, dado que evaluadores independientes obtuvieron distribuciones de Cap-Score similares cuando remuestrearon la misma población de espermatozoides. De manera colectiva, estos datos proporcionan fuertes evidencias de que la SFT Cap-Score es altamente reproducible y fiable dentro de, y entre, evaluadores, lo cual son consideraciones clave cuando se intenta evaluar la habilidad reproductora masculina.

Los datos presentados en el presente estudio demuestran que la SFT Cap-Score es altamente reproducible y fiable dentro de, y entre, evaluadores. Los datos y los archivos de imágenes adquiridos deben servir como base para el control de calidad (QC) y la garantía de calidad (QA) continuos dentro de, y entre, laboratorios en la evaluación del valor de Cap-Score. Por ejemplo, dos de los 20 archivos de imágenes, uno de cada uno de los grupos de “valores de Cap-Score inferiores” y “supuestamente fértil”, pueden seleccionarse aleatoriamente y puntuarse cada día para demostrar la capacidad diaria del evaluador para evaluar valores de Cap-Score. Si se obtienen valores que están fuera de intervalos aceptables con respecto a la media establecida (Westgard *et al.*, “A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry”, Clin Chem. 27: 493-50 (1981), puede consultarse al director de laboratorio para buscar una solución. Estos datos también pueden usarse para realizar un seguimiento de evaluadores individuales a lo largo del tiempo y para identificar posibles cambios en la determinación del valor de Cap-Score. De manera similar, a medida que se da formación y se incorpora nuevo personal y (o) laboratorios en la rotación de evaluación, puede evaluarse su capacidad de evaluación puntuando múltiples archivos de imágenes y comparando sus valores de Cap-Score con valores establecidos. Un enfoque de este tipo garantizará datos comparables tanto dentro de, como entre, laboratorios. Sólo mediante QA y QC internos y externos continuos pueden mantenerse altos niveles de evaluaciones de la función de espermatozoides.

El diagnóstico de la fecundidad masculina se ha visto plagado históricamente por la incapacidad de evaluar la función de espermatozoides; concretamente, la capacidad para fecundar (Oehninger *et al.*, “Sperm functional tests”, Fertil Steril. 102: 1528-33 (2014); Wang *et al.*, “Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests”, Fertil Steril. 102: 1502-07 (2014)). Una capacidad de diagnóstico de este tipo proporcionará un complemento funcional a las evaluaciones descriptivas de evaluaciones de semen tradicionales. Identificar espermatozoides con deficiencias en la capacidad de fecundación puede permitir un diagnóstico más específico de lo que ahora se clasifica como esterilidad idiopática. Con una importancia práctica mucho mayor, esta información puede permitir que un médico ayude a aconsejar a una pareja sobre la forma más apropiada de ART para lograr un embarazo. Para lograr el objetivo anteriormente especificado, se han sugerido muchos ensayos de la función de espermatozoides (por ejemplo, ensayos de penetración de zona de hámster (Barros *et al.*, “Human Sperm Penetration into Zona-Free Hamster Oocytes as a Test to Evaluate the Sperm Fertilizing Ability”, Andrologia. 11: 197-210 (1979); Rogers *et al.*, “Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova”, Fertil Steril. 32: 664-70 (1979), pruebas de unión espermatozoide-ZP (Liu *et al.*, “Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in *in vitro* fertilization-embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs”, Fertil Steril. 82: 1251-63 (2004) y ensayos de penetración de mucosa del cuello uterino (Alexander, “Evaluation of male infertility with an *in vitro* cervical mucus penetration test”, Fertil Steril. 36: 201-8 (1981); Menge *et al.*, “Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples.” Fertil Steril. 51: 486-92 (1989); Eggert-Kruse *et al.*, “Prognostic value of *in vitro* sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus”, Fertil Steril. 51: 317-23 (1989). Sin embargo, su uso se ha visto limitado por la gran dificultad para obtener materiales necesarios de una manera logísticamente práctica. Para cubrir el hueco actual, se ha desarrollado una

herramienta de diagnóstico para evaluar la capacidad de los espermatozoides para experimentar los cambios fisiológicos requeridos para fecundar un ovocito.

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar un enfoque para lograr la fecundación de mamíferos que comprende las etapas de:

- 5 obtener mediante obtención de imágenes una o más imágenes de fluorescencia de t_0 a partir de una primera muestra de espermatozoides capacitados *in vitro* tratada con un marcador de fluorescencia, en el que los espermatozoides presentan uno o más patrones de localización de G_{M1} ,
 en el que dichas imágenes de fluorescencia de t_0 se obtienen a tiempos tras la capacitación *in vitro*
 10 seleccionados de: de 0,1 horas a 5 horas; de 0,1 horas a 8 horas; de 0,1 a 12 horas; o de 0,1 horas a 18 horas;
 medir un número de patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA), un número de patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM) y un número total de patrones de localización de G_{M1} presentados en una o más imágenes de fluorescencia de t_0 para determinar un porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 ,
 15 comparar el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 medido con un porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] para determinar un estado de fecundidad; e
 20 identificar un enfoque reproductor para lograr la fecundación de mamíferos basándose en el estado de fecundidad determinado,
 en el que un porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] correspondiente a: más del 35% indica un estado de fecundidad alta; una desviación estándar por debajo del 35% indica un estado de fecundidad media; y dos o más desviaciones estándar por debajo del 35% indica un estado de fecundidad baja.

2. Método según la reivindicación 1, en el que si el macho tiene una concentración de espermatozoides al menos normal, entonces

- 35 el enfoque reproductor para el estado de fecundidad alta se selecciona del grupo que consiste en: coito, inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina;
 el enfoque reproductor para el estado de fecundidad media se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical; inseminación intrauterina (IUI); capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; o fecundación *in vitro* (IVF) o capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*; o
 40 el enfoque reproductor para el estado de fecundidad baja se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia intratubárica de gametos (GIFT), capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos, inseminación subzonal (SUZI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

3. Método según la reivindicación 2, en el que si el enfoque reproductor corresponde a la capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferencia intratubárica de gametos (GIFT) o inseminación subzonal (SUZI), entonces el periodo de tiempo para la capacitación previa antes de la inseminación corresponde a incubar espermatozoides en medios que contienen uno o más estímulos para la capacitación, durante periodos de 24 horas antes de la inseminación; 18 horas antes de la inseminación; 12 horas antes de la inseminación; 6 horas antes de la inseminación; 4 horas antes de la inseminación; 3 horas antes de la inseminación; o 1 hora antes de la inseminación.

4. Método según la reivindicación 3, en el que el método comprende además las etapas de:

- 60 obtener mediante obtención de imágenes una o más imágenes de fluorescencia de t_1 a partir de una segunda muestra de espermatozoides capacitados *in vitro* obtenida a partir del mismo macho que la primera muestra y tratada con un marcador de fluorescencia que presenta uno o más patrones de localización de G_{M1} , en el que dichas imágenes de fluorescencia de t_1 se obtienen a un tiempo tras la capacitación t_1 , en el que t_1 es mayor que t_0 o mayor de 18 horas;
 medir un número de patrones de localización de G_{M1} en acrosoma apical (AA), un número de patrones de localización de G_{M1} en membrana plasmática acrosómica (APM) y un número total de patrones de localización de G_{M1} presentados en una o más imágenes de fluorescencia de t_1 para determinar un porcentaje de [patrones de

localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 ;

comparar el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 con el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 para determinar un tiempo de capacitación *in vivo*,

en el que una diferencia en el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 y el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 de más de una desviación estándar con respecto a un patrón del 35% indica un tiempo de capacitación *in vivo* de más de 12 horas; y una diferencia de menos de una desviación estándar con respecto al patrón del 35% indica un tiempo de capacitación *in vivo* de menos de 12 horas;

además, si se determina que el tiempo de capacitación *in vivo* es de más de 12 horas, entonces se determina un estado de fecundidad de t_1 basándose en una comparación del porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 medido con el porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM]; o, si se determina que el tiempo de capacitación *in vivo* es de menos de 12 horas, entonces se determina un estado de fecundidad de t_1 basándose en una comparación del porcentaje de referencia de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] con el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_1 medido o el porcentaje de [patrones de localización de G_{M1} en AA más patrones de localización de G_{M1} en APM] de t_0 medido; y

basándose en el estado de fecundidad de t_1 del macho y el tiempo de capacitación *in vivo*, identificar un periodo de tiempo para la inseminación y un enfoque reproductor para usar con el fin de lograr la fecundación.

5. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de identificación también se basa en uno o más de los siguientes: datos demográficos de paciente, estado reproductor de la pareja femenina, concentración de espermatozoides, movilidad total, movilidad progresiva, volumen de semen, pH de semen, viscosidad de semen y/o morfología de espermatozoides y combinaciones de los mismos.

6. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que los más de un patrón de localización de G_{M1} incluyen patrón de localización de G_{M1} en AA, patrón de localización de G_{M1} en APM, patrón de localización de G_{M1} en células de revestimiento, patrón de localización de G_{M1} inter., patrón de localización de G_{M1} en PAPM, patrón de localización de G_{M1} en AA/PA, patrón de localización de G_{M1} en ES y patrón de localización de G_{M1} dif.

7. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que los espermatozoides se han tratado *in vitro* con condiciones de capacitación durante un periodo de tiempo de capacitación de: al menos una hora; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; durante un periodo de tiempo de capacitación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 24 horas; 12 horas y 24 horas; o 18 horas y 24 horas.

8. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que los espermatozoides capacitados *in vitro* se han tratado con un agente de fijación durante un periodo de tiempo de fijación de: al menos 0,5 horas; al menos 3 horas; al menos 12 horas; al menos 18 horas; al menos 24 horas; al menos 30 horas; al menos 36 horas; o al menos 48 horas, durante un periodo de tiempo de fijación que oscila entre 0,5 horas y 3 horas; 3 horas y 12 horas; 6 horas y 12 horas; 3 horas y 18 horas; 6-18 horas; 6-24 horas; 12 horas y 24 horas; 18 horas y 24 horas; 18-30 horas; 18-36 horas; 24-30 horas; 24-26 horas; 18-48 horas; 24-48 horas; o 36-48 horas.

9. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que los espermatozoides se tratan con procedimientos de crioconservación y se almacenan antes de tratarse *in vitro* con condiciones de capacitación.

10. Método según la reivindicación 1, en el que si el macho tiene una concentración de espermatozoides inferior a la normal, entonces

el enfoque reproductor para el estado de fecundidad alta se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina;

el enfoque reproductor para el estado de fecundidad media se selecciona del grupo que consiste en: inseminación intracervical (ICI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intracervical, inseminación intrauterina (IUI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación intrauterina; fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*; o

el enfoque reproductor para el estado de fecundidad baja se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), capacitación previa de espermatozoides antes de la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), capacitación previa de espermatozoides antes de la inyección

intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia intratubárica de gametos (GIFT), capacitación previa de espermatozoides antes de la transferencia intratubárica de gametos, inseminación subzonal (SUZI) o capacitación previa de espermatozoides antes de la inseminación subzonal.

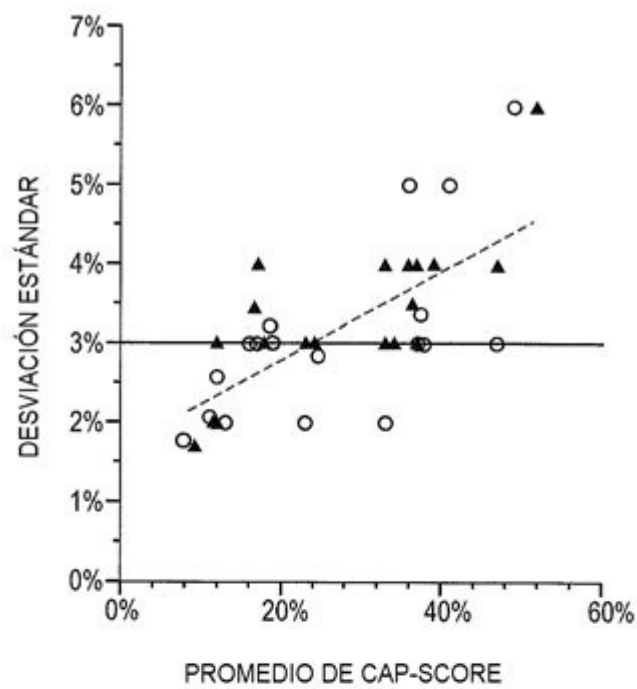


FIG. 1A

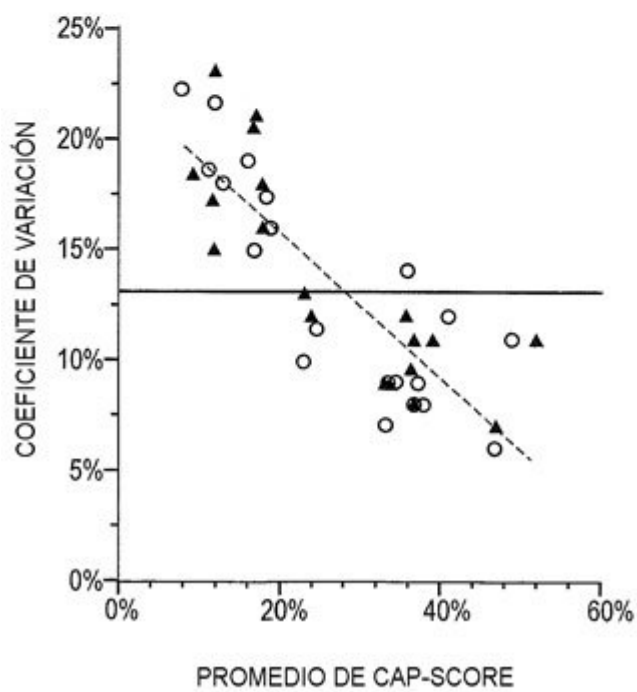


FIG. 1B

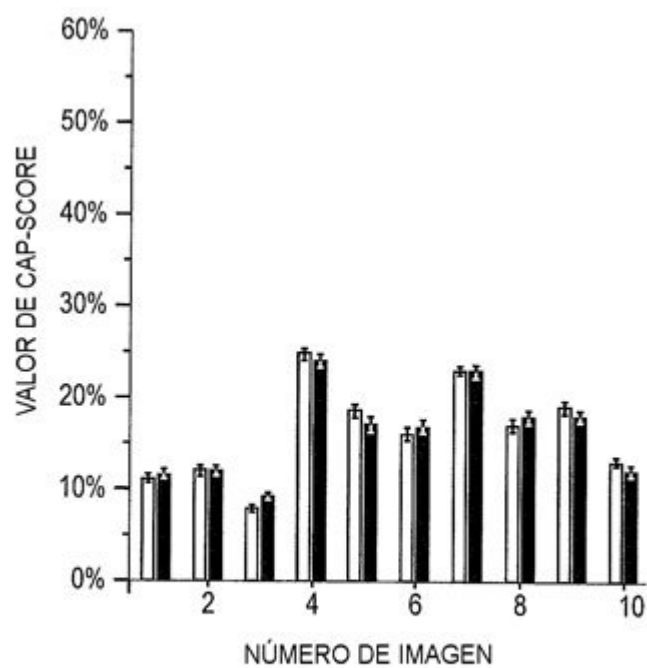


FIG. 2A

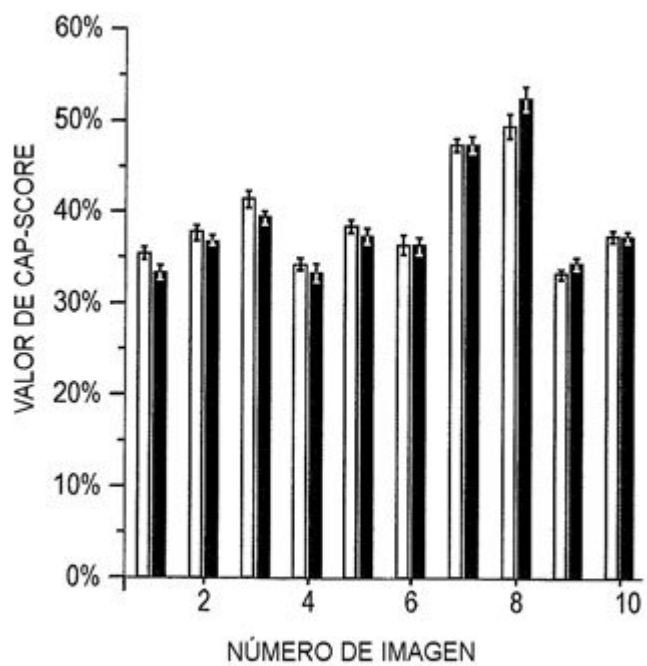


FIG. 2B

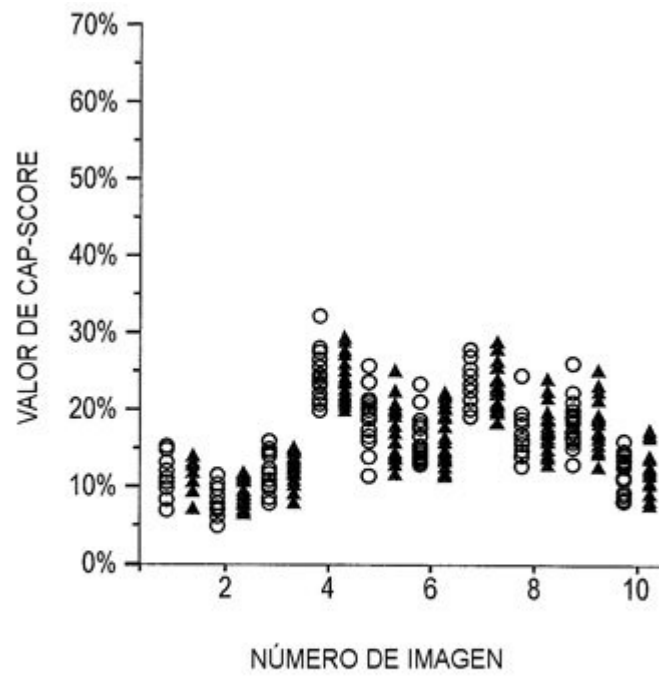


FIG. 3A

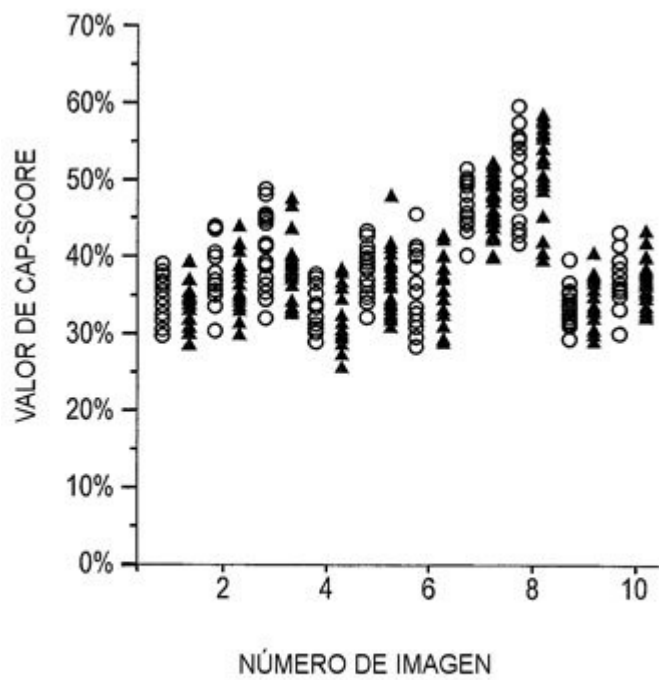


FIG. 3B

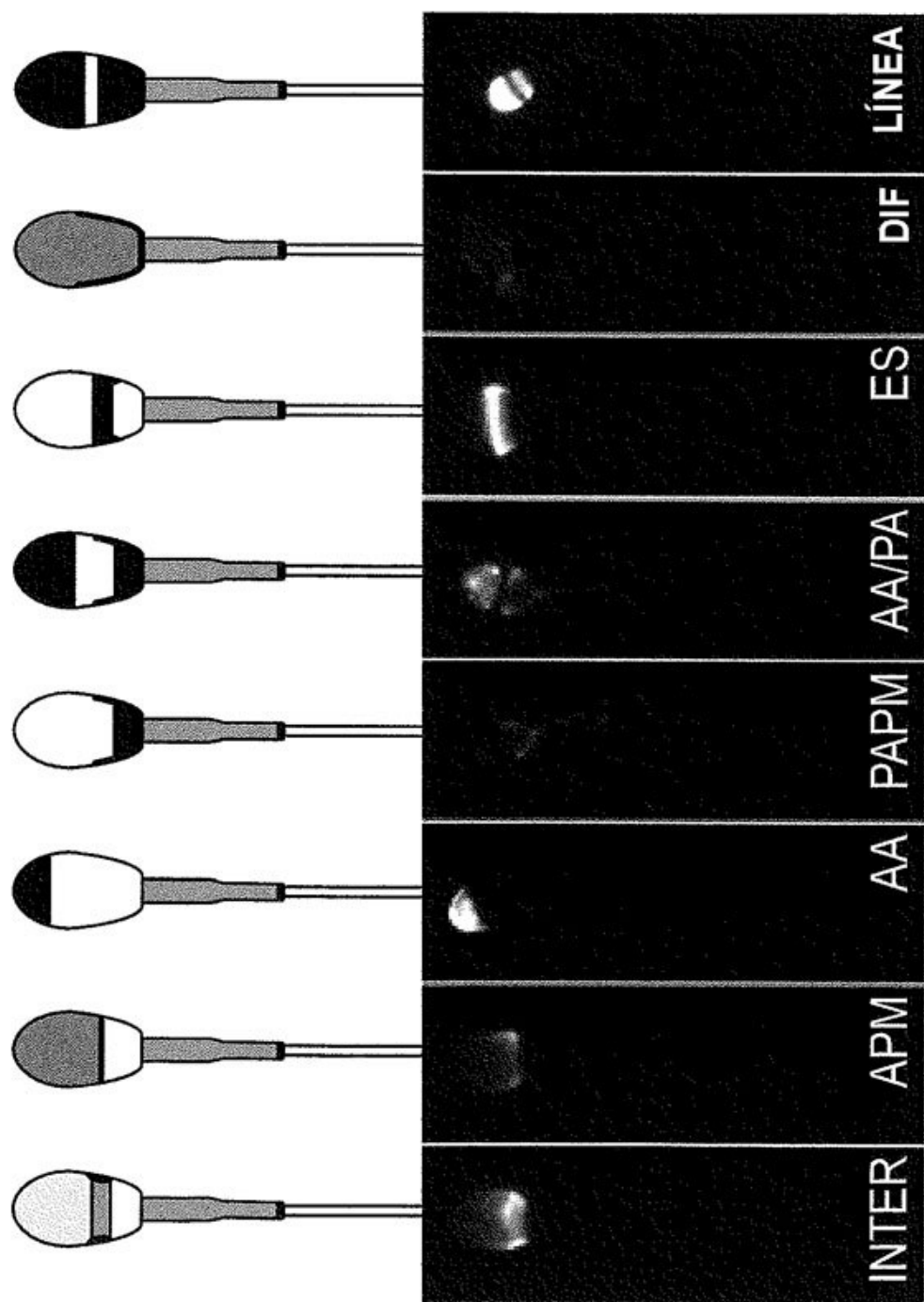


FIG. 4