(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
10 de mayo de 2012 (10.05.2012)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/059615 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/50 (2006.01) *C12Q 1/32* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070756

(22) Fecha de presentación internacional:
4 de noviembre de 2011 (04.11.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201031624
4 de noviembre de 2010 (04.11.2010) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: **UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA** [ES/ES]; Edifici A, Campus Universitari s/n, E-08193 Bellaterra (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **BENET CATALÁ, Jordi** [ES/ES]; Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, TorreM3, Department Biologia Cel·lular, Edifici M, Fisiologia i Immunologia Facultat de Medicina, E-08193 Bellaterra (ES). **GARCÍA PEIRÓ, Agustín** [ES/ES]; C/ Sentmenat 3, Porta C, E-08192 Sant Quirze del Vallès (ES).

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

WO 2012/059615 A1

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN A CELLULAR POPULATION

(54) Título : MÉTODO PARA DETERMINAR LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN UNA POBLACIÓN CELULAR

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining the production of reactive oxygen species in a cellular population. The invention also relates to a method for determining the need for an antioxidant treatment of a male subject, and to a method for identifying a substance that can reduce the reactive oxygen species in a cellular population.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método para determinar la producción de especies reactivas de oxígeno en una población celular. Asimismo, la invención se refiere a un método para determinar la necesidad de una terapia antioxidante de un sujeto masculino y a un método para identificar una sustancia con capacidad de disminuir las especies reactivas de oxígeno presentes en una población celular.

MÉTODO PARA DETERMINAR LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN UNA POBLACIÓN CELULAR

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método para determinar la producción de especies reactivas de oxígeno en una población celular. Asimismo, la invención se refiere a un método para determinar la necesidad de una terapia antioxidante de un sujeto masculino y a un método para identificar una sustancia con capacidad de disminuir las especies reactivas de oxígeno presentes en una población celular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La fertilidad se define como la capacidad que tienen los seres vivos de reproducirse. En base a este concepto, se asume que la esterilidad es la pérdida de esta capacidad y se estima que afecta a un 15% de las parejas en edad reproductora. Aproximadamente, en la mitad de los casos el factor masculino está presente: en un 20% es exclusivamente masculino, el 38% es predominantemente femenino, y en otro 27% se considera mixto mientras que en el 15% restante no se encuentra una causa específica, siendo estos casos clasificados como infertilidad de origen desconocido o idiopática. Según la American Society for Reproductive Medicine (The practice committee of The American Society for Reproductive Medicine, 2006) se considera la infertilidad como una patología siempre y cuando la pareja no consiga concebir en un periodo mínimo de 12 meses. A pesar de esto, entre un 20% - 30% consiguen tener descendencia superado este tiempo.

Para el diagnóstico de la infertilidad masculina, además de los principales parámetros que se determinan en el seminograma (concentración, movilidad y morfología espermática), recientemente se ha empezado a considerar un nuevo parámetro, la fragmentación del ADN espermático. El análisis de la fragmentación del ADN espermático determina la existencia de roturas en una o en las dos cadenas del ADN. Esto ha suscitado un cierto interés debido a que la presencia de estas roturas comprometen la capacidad del individuo para conseguir una descendencia sana al verse alterado el mensaje genético paterno. Efectivamente, en los últimos años, son varios los

estudios que demuestran la presencia de un elevado porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado en individuos infértiles respecto a los individuos fértiles (Evenson DP et al. Theriogenology 15:979-91 (2006)). La consecuencia ha sido inmediata en el ámbito del diagnóstico clínico de la infertilidad masculina y se empieza a valorar como marcador de calidad espermática puesto que la fragmentación del ADN ofrece un valor que complementa a los parámetros del seminograma, si bien es cierto que el valor predictivo respecto a la fertilidad es aún objeto de estudio (Zini y Sigman. J Androl. 30(3):219-29 (2009)).

En la actualidad, los valores que relacionan fragmentación del ADN con bajo potencial de fertilidad "*in vivo*" o "*in vitro*" estarían entre un 30-40% de espermatozoides afectados (Evenson DP y Wixon R. Fertil Steril 90(4): 1229-31 (2008)). En estos casos, el riesgo de abortos recurrentes, fallo en la implantación o de desarrollo embrionario anormal aumenta significativamente (Carrell DT et al. Arch Androl 49 (1): 49-55 (2003)). Por otra parte, cabe esperar que en individuos fértiles y sin otras patologías, el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado se sitúe por debajo del 20% mientras que valores intermedios entre el 20% y el 30% de fragmentación estarían indicando una situación anormal si bien aún no se podría relacionar con infertilidad (Erenpreiss J et al. Asian J Androl 8(1): 11-29 (2006)).

La etiología de la fragmentación del ADN espermático es multifactorial y aunque los mecanismos que provocan estas alteraciones están en parte identificados, no se sabe con absoluta certeza cuál es la procedencia de este daño (Tesarik et al. Reprod Biomed Online 12:715-21 (2006), Angelopoulo R et al. Reprod Biol Endocrinol 5:36 (2007)). No obstante, a nivel intrínseco, se ha propuesto que alteraciones durante la espermiogénesis afectan a la compactación del núcleo espermático, produciendo un estado de vulnerabilidad a ciertas formas de estrés oxidativo que producirían la rotura del ADN (Aitken RJ y De Iuliis GN. Mol Hum Reprod. 2009 Jul 31).

El estrés oxidativo está considerado como una de las principales causas de fragmentación del ADN espermático. De modo general, por estrés oxidativo se entiende que en el órgano afectado, se está produciendo un desequilibrio metabólico, al no ser capaz el organismo de neutralizar rápidamente las especies reactivas de oxígeno que se

producen como consecuencia del constante aporte de energía metabólica que necesita para su actividad. De este modo, al acumularse producen daños en todos los componentes de la célula, entre ellos en el ADN, oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y oxidación de aminoácidos en las proteínas.

Diversos estudios han demostrado que las especies reactivas de oxígeno, de origen tanto endógeno como exógeno, pueden inducir la rotura del ADN espermático *in vitro* o *in vivo* confirmando el papel que los radicales libres desempeñan en la etiología de la infertilidad masculina (Iwasaki A y col Fertil Steril. 1992;57:409–16, Zini A Int J Androl. 1993;16:183–8, Tremellen K Reprod Update. 2008 May-Jun;14(3):243-58).

Se estima que entre el 25% - 50% de los pacientes infértiles presentan concentraciones anómalas de especies reactivas de oxigeno (Twigg J et al., Hum Reprod. 1998;13:1429–36, Aitken RJ et al., Biol Reprod. 1998;59:1037–46, Sawyer DE Mutat Res. 2003;529:21–34).

En el caso particular de pacientes diagnosticados con varicocele, principal patología corregible quirúrgicamente y que representa entre 19% - 41% de los casos de infertilidad, la presencia de especies reactivas de oxigeno puede ser incluso mayor respecto a otros pacientes infértiles (T. Mostafa et al., Andrologia 41 (2009), pp. 125–129, Naughton CK. Et al., Hum Reprod Update 7 (2001), pp. 473–481).

Dentro de este contexto, parece obvio que el tratamiento racional con terapias antioxidantes podría ayudar a mejorar la integridad del ADN espermático dado que su principal efecto está dirigido a mantener el equilibrio homeostático mediante la neutralización de especies reactivas de oxigeno. En efecto, varios estudios han demostrado un resultado positivo de ciertos tratamientos con antioxidantes sobre la fragmentación del ADN espermático y otros parámetros seminales de relevancia como son la concentración, movilidad o la morfología espermática (Agarwal A. et al., Reprod Biomed Online. 2004 Jun;8(6):616-27., Greco E. et al., J Androl. 2005 May-Jun;26(3):349-53, Ménézo YJ. et al., Reprod Biomed Online. 2007 Apr;14(4):418-21). Si bien estos estudios son escasos y los tamaños muestrales insuficientes, los datos

actuales apuntan a que el tratamiento con antioxidantes orales contribuyen a preservar la integridad del ADN espermático. Idealmente, la administración de tratamientos antioxidantes debería recomendarse tras determinar la presencia de estrés oxidativo en la muestra del paciente.

La determinación de estrés oxidativo en muestras de semen en los laboratorios de andrología no está incluida en la práctica rutinaria porque los métodos actuales son caros, complejos y están poco estandarizados.

En la actualidad existen unos 30 métodos para determinar estrés oxidativo (Ochsendorf FR. Hum Reprod Update. 1999 Sep-Oct;5(5):399-420). Estos métodos se clasifican en métodos directos, indirectos y signos centinelas.

Los métodos directos determinan el daño producido por el exceso de especies reactivas de oxígeno contra los fosfolípidos presentes en la membrana plasmática o en el ADN. Los métodos directos determinan un daño que es el producto final de un desequilibrio entre la producción excesiva de radicales libres y la capacidad antioxidante de la célula. Dentro de este grupo podemos encontrar el test del ácido tiobarbitúrico que requiere de cromatografía de alta resolución (HPLC) o la determinación de isoprostano 8-Iso-PGF2a o el ensayo c11-BODIPY. Estos tests son bastante prometedores pero no se utilizan de forma rutinaria por su complejidad.

Los métodos indirectos son por lo general muy sensibles y tienen la ventaja de que los valores de normalidad dentro de controles fértiles e infértiles están relativamente bien determinados. Estos métodos determinan la presencia de especies reactivas de oxígeno (en adelante ERO) en muestras de semen. Las ERO incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas que se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un papel importante en la señalización celular. Son por lo general métodos basados en quimioluminiscencia utilizando Luminol o Lucigenina (Athayde KS. et al. *J. Androl.* 2007, 28:613-20). Sin embargo, la lucigenina tiende a autoxidarse provocando alteraciones en los resultados, y por otra

parte, el análisis requiere de un luminómetro que es un instrumental muy costoso. Tunc et al. (Int. J. Androl., 33:13-21) han descrito un ensayo indirecto de fertilidad basado en la detección de ERO mediante el uso de NBT como indicador. En las células que contienen ERO, el NBT se transforma en formazán, dando lugar a un precipitado coloreado. No obstante, este método tiene la desventaja de que los espermatozoides de la muestra tienden a agregar y sedimentar en las condiciones en las que se incuban para dar lugar a la formación de formazán, lo que dificulta la determinación del porcentaje de espermatozoides que contienen ERO.

Por último, existe un conjunto de indicadores (signos centinelas) que indican la presencia de estrés oxidativo estos son: poca movilidad espermática, teratozoospermia, presencia de leucocitos en semen, aumento de la viscosidad, test HOST positivo o mala integridad de membrana.

Existe por tanto la necesidad de encontrar un método económico y sencillo de realizar para determinar la presencia de ERO en una población celular.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la presencia de células que contienen especies reactivas de oxígeno en una población celular que comprende:

a) Poner en contacto en condiciones isotónicas dicha población celular con un agente espesante de forma que se reduzca sustancialmente la movilidad de las células de la población celular y con un compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno,

b) mantener la mezcla obtenida en el paso a) durante el tiempo suficiente para la conversión del compuesto indicador en un compuesto detectable en aquellas células que contengan especies reactivas de oxígeno,

c) colocar la mezcla obtenida en b) con un agente gelificante sobre un soporte sólido en condiciones adecuadas para que se produzca la gelificación del agente gelificante y

d) identificar aquellas células en las que aparece el compuesto detectable

en donde la presencia del compuesto detectable en una célula es indicativo de la presencia en dicha célula de especies reactivas de oxígeno.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para determinar la necesidad de una terapia antioxidante a un paciente que comprende determinar la presencia en una muestra de semen de dicho sujeto de células que contienen ERO usando un método de la invención y el porcentaje de células que presentan fragmentación de ADN usando un método de la invención en donde si el porcentaje de células que comprenden ERO y el porcentaje de células que presentan fragmentación de ADN son superiores a dichos porcentajes en una muestra de referencia es indicativo de que dicho paciente debería ser tratado con una terapia antioxidante.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para identificar una sustancia X con capacidad de disminuir las especies reactivas de oxígeno presentes en una población celular que comprende:

a) poner en contacto dicha sustancia con dicha población celular,

b) Poner en contacto en condiciones isotónicas dicha muestra biológica con un agente espesante de forma que se reduzca sustancialmente la movilidad de las células de la población celular y con un compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno,

c) mantener la mezcla obtenida en el paso b) durante el tiempo suficiente para la conversión del compuesto indicador en un compuesto detectable en presencia de especies reactivas de oxígeno,

d) colocar la mezcla obtenida en c) con un agente gelificante sobre un soporte sólido en condiciones adecuadas para que se produzca la gelificación del agente gelificante y

e) cuantificar la proporción de células en las que aparece el compuesto detectable

en donde una disminución de la proporción de células que muestran un cambio en la coloración con respecto a la muestra de referencia es indicativo de que la sustancia X es capaz de disminuir en dichas células la presencia de especies reactivas de oxígeno.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un agente espesante y un compuesto con capacidad indicador de la presencia de ERO.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende un agente espesante, un compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno, una solución ácida que desnaturalice el ADN y una solución de lisis que elimine las proteínas nucleares.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de una composición o de un kit que comprende un agente espesante y un compuesto indicador de la presencia de ERO para determinar la presencia de especies reactivas de oxígeno en una población celular.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit que comprende un agente espesante, un compuesto indicador de la presencia de ERO, una solución ácida que desnaturalice el ADN y una solución de lisis que elimine las proteínas nucleares para determinar la necesidad de una terapia antioxidante de un sujeto masculino.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Vista al microscopio de espermatozoides con NBT en medio líquido. Obsérvese que los espermatozoides tienden a agregarse por lo que los espermatozoides NBT positivos (que presentan ERO) pueden afectar a los NBT negativos.

Figura 2. Vista al microscopio de espermatozoides NBT positivos. Presentan un precipitado de color azul intenso localizado normalmente sobre la pieza intermedia y la cabeza.

Figura 3. Vista al microscopio óptico de una extensión de espermatozoides humanos inmersos en agarosa negativos para NBT, que no presentan ERO.

Figura 4. Gráfico de bigotes y cajas en donde se representan los datos obtenidos para la variable SDF (porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN) según el tipo de agarosa que se ha utilizado: normales (izquierda), modificadas con NBT (derecha).

Figura 5. Gráfico de bigotes y cajas en donde se representan los datos obtenidos para la variable DS (porcentaje de espermatozoides degradados) según el tipo de agarosa que se ha utilizado: normales (izquierda), modificadas con NBT (derecha).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Primer método de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un método para la determinación de la presencia de células que contienen ERO en una población celular en una muestra biológica. Así, según se observa en el ejemplo de la presente invención, la puesta en contacto de una población celular con un agente indicador de la presencia de ERO y en presencia de un agente viscosizante permite detectar aquellas células entre la población que presentan ERO evitando los problemas asociados al estado de la técnica resultantes de la agregación de las células.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método (en adelante primer método de la invención) para determinar la presencia de células que contienen ERO en una población celular que comprende:

a) Poner en contacto en condiciones isotónicas dicha población celular con un agente espesante de forma que se reduzca sustancialmente la movilidad de las células de la población celular y con un compuesto indicador de la presencia de ERO,

b) mantener la mezcla obtenida en el paso a) durante el tiempo suficiente para la conversión del compuesto indicador en un compuesto detectable en aquellas células que contengan ERO,

c) colocar la mezcla obtenida en b) con un agente gelificante sobre un soporte sólido en condiciones adecuadas para que se produzca la gelificación del agente gelificante y

d) identificar aquellas células en las que aparece el compuesto detectable

en donde la presencia del compuesto detectable en una célula es indicativo de la presencia en dicha célula de ERO.

Por "ERO" se entiende el conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Son moléculas muy reactivas debido a que poseen electrones desapareados que les hacen reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de oxido-reducción. Ejemplos de ERO son iones de oxígeno, radicales libres y los peróxidos entre otros.

Por "población celular" se entiende, en el contexto de la presente invención, cultivos celulares de células eucariotas, en particular, células humanas, así como poblaciones de células primarias derivadas de la médula ósea, de la sangre, células usadas en técnicas de fertilización *in vitro* y similares. En una forma preferida de realización, la población celular es una población de espermatozoides.

El término "espermatozoide", según se usa en la presente invención, se refiere a las células reproductivas del cualquier sujeto masculino (hombre, buey, etc.). La población de células puede encontrarse formando parte de una muestra de semen junto con el plasma seminal o diluido en una solución adecuada para preservar la integridad de los espermatozoides.

En una primera etapa, el primer método de la invención comprende poner en contacto en condiciones isotónicas dicha población celular con un agente espesante de forma que se reduzca sustancialmente la movilidad así como la sedimentación y agregación de las células de la población celular y con un compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno,

Por "condiciones isotónicas" se refiere a las condiciones en las que a igual temperatura dos soluciones tienen la misma presión osmótica de forma que, si dichas soluciones se encuentran separadas por una membrana semipermeable, no existe flujo neto de agua a través de dicha membrana. Por "presión osmótica" se entiende la presión que ejercen las partículas del disolvente en una disolución sobre la membrana semipermeable que la separa de otra de mayor concentración. Las condiciones isotónicas son necesarias para mantener la integridad de la membrana plasmática celular. Condiciones isotónicas típicas incluyen 285-315 mOsm/kg H2O, dependiendo del tipo celular.

El término "agente espesante" se usa de forma intercambiable con "agente que aumente la viscosidad" o "agente viscosizante" y se entiende por aquel compuesto que incrementa la resistencia interna de una sustancia a fluir cuando se aplica un esfuerzo constante. Como consecuencia del aumento de la resistencia, las células muestran una menor tendencia a agregarse y además las células móviles en una mezcla con dicho compuesto tienen menor movilidad. Agentes espesantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación:

(i) Polímeros de ácidos carboxílicos formados por polímeros entrecruzados formados por polímeros de ácido acrílico, ácido acrílico sustituido, sales y ésteres del ácido acrílico e incluyen compuestos de la familia de los carbopoles, incluyendo carbopoles carbopoles de la serie 900 (por ejemplo, Carbopol 854), carbopol#1342, Carbopol# 1382, Pemulen TR-1 y Pemulen TR-2,

(ii) Polímeros de poliacrilato entrelazados

(iii) Polímeros de poliacrilamida y, en particular, polímeros de poliacrilamida no iónicos tanto ramificados como no ramificados y formados por monómeros de acrilamida y metacrilamida sustituidos con uno o dos grupos alquilo (C1 a C5). Monómeros preferidos incluyen, sin limitación, acrylamida, metacrilamida, N-metacrilamida, N-metilmetacrilamida, N,N-dimetilmetacrilamida, N-isopropilacrilamida, N-isopropilmetacrilamida y N,N-dimetilacrilamida. Estos polímeros tienen un peso molecular generalmente superior a 1000000, preferiblemente superior a 1500000 y hasta 3000000. Polímeros preferidos de esta categoría incluyen Sepigel 305 from Seppic Corporation (Fairfield, NJ),

Hypan SR150H, SS500V, SS500W, SSSA100H, from Lipo Chemicals, Inc., (Patterson, NJ).

(iv) Polisacáridos tales como agarosa, celulosa, carboximetil hidroxietilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietil etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, celulosa microcristalina, celulosa sulfato sódico, y mezclas de las mismas. También resultan útiles las celulosas sustituidas por grupos alquilo en donde los grupos hidroxilo de las celulosas se encuentran hidroxialquiladas (preferiblemente hidroxietiladas o hidroxipropiladas) para formar celulosas hidroxialquiladas que se modifican posteriormente con un cadena lineal o ramificada C10-C30 a través de un enlaces tipo éter. Ejemplos de grupos alquilo que se usan para modificar las hidroxicelulosas incluyen estearil, isoestearil, lauril, miristil, cetil, isocetil, cocoil, palmitil, oleil, linoleil, linolenil, ricinoleil, behenil. Hidroxicelulosas preferidas incluyen cetil hidroxyetilcelulosa (Natrosol (3) CS Plus de Aqualon Corporation).

(v) gomas incluyendo gomas de acacia, agar, algin, ácido alginico, alginato amónico, amilopectina, alginato de calcio, carragenano de calcio, carnitina, carragenano, dextrina, gelatina, goma gellan, goma guar, guar hidroxipropiltrimonio cloruro, hectorita, ácido hialurónico, quitosano, guar hidroxipropli, goma karaya gum, kelp, goma de locust bean, goma natto, alginato de potasio, alginato de proplién glicol, goma escleroio, dextrano carboximetil sodio, sodio carrageenano, goma tragacanto, goma xantanay sus mezclas.

(vi) copolímeros entrelazados de éter vinilo y anhídrido maleico tales como PVM/MA.

(vii) Polímeros entrecruzados de polivinilpirrolidonas tales como ACP-1120, ACP-1179, and ACP1180, available from International Specialty Products (Wayne, NJ).

(viii) Agentes espesantes no incluidos en ninguno de los grupos anteriores tales como alginatos; carbomeros tales como los carbomeros 934, 934P, 940 y 941; goma de celuosa, alcoholo de cetearilo, cocamida DEA, dextrina; gelatina; hidroxietilcelulosa; hidroxipropilcelulosa; hidroxipropil metilcelulosa; silicato

de magnesio y aluminio, alcohol de miristilo; harina de avena; oleamida DEA; alcohol olieco; PEG-7M; PEG-14M; PEG-90M; estearamida DEA; estearamida MEA; almidón de trigo, goma xantana y similares.

La etapa a) del primer método de la invención se lleva a cabo de forma que se reduzca sustancialmente la movilidad de las células de la población celular, preferiblemente durante el tiempo en que se lleva a cabo la etapa a). Por reducción sustancial de la movilidad de las células de la población celular se entiende que las células reducen su capacidad natural de movimiento o desplazamiento en al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o un 100%, en cuyo caso las células no se desplazan apreciablemente durante el tiempo en que se lleva a cabo la etapa a). En el caso de que la población celular objeto de estudio sea una población de espermatozoides, el experto en la materia puede determinar las condiciones (concentración y temperatura) a la que un determinado agente espesante reduce la movilidad celular hasta valores adecuados para evitar la agregación celular usando métodos ampliamente conocidos tales como:

- Métodos colorimétricos tales como el comercializado bajo la marca Fertell en el que la muestra que contiene espermatozoides se calienta a 37ºC y en donde los espermatoziodes móviles se detectan en base a su capacidad para nadar hasta un sensor recubierto con anticuerpos anti-CD95 conjugado con oro coliodal.
- Test colorímetricos tales como los descritos en WO 93/22053 y en US 5,434,027.
- Ensayos basados en dispositivos con microcanales en los que los espermatozoides móviles acceden a un detector y en donde la detección se lleva a cabo usando un indicador fluorescente que es captado por el espermatozoide y convertido en un agente detectable.
- Métodos basados en la inspección visual de espermatozoides desplazándose a través de un microcanal hacia un oocito.
- Métodos basados en la detección de variaciones en la densidad óptica de una muestra debida a la movilidad de las células tal y como se describe en US4,176,953.

- Métodos basados en la detección de variaciones en la recepción de ondas acústicas causadas por el paso de espermatozoides a través de un microcanal tal y como se describe en WO07085839A.

La etapa a) comprende adicionalmente la puesta en contacto de la población celular objeto de estudio con un agente indicador de la presencia de ERO.

El término "agente indicador de la ERO", según se usa en la presente invención, se refiere a todo aquel compuesto que en presencia de ERO sufra un cambio en sus propiedades de manera que sea detectable, bien directamente por alguna propiedad de dicho compuesto bien indirectamente porque dicho compuesto tiene la capacidad de modificar una segunda molécula que es detectable.

Compuestos indicadores de ERO preferidos incluyen sales de tetrazolio, derivados y análogos. Las sales de tetrazolio son compuestos que presentan una estructura de tetrazol, tetrazolil o tetraozolo. La sal tetrazolio es una sal orgánica que comprende uno o dos anillos de tetrazol y una o más sustituciones con un resto arilo (fenilo o fenilo sustituido) o naftilo en distintas posiciones, preferiblemente en las posiciones 1, 2, 3 y 5. Típicamente, las sales de tetrazolio que comprenden dos anillos de tetrazol se encuentran acopladas de forma que aportan un grupo defenilo o un grupo naftilo en donde los grupos tetrazol se encuentran las dos posiciones para.

Los compuestos que en presencia de ERO sufren un cambio en sus propiedades de manera que son detectables que se pueden emplear para la realización de la presente invención pueden ser, entre otros, los indicados en la Tabla 1 descritos en la patente estadounidense US6368818.

TABLA 1: COMPUESTO INDICADORES DE LA PRESENCIA DE ERO ADECUADOS PARA SU USO SEGÚN LA INVENCIÓN		
I	pABT	Cloruro p-anisil azul de tetrazolio
II	pApNBT	Cloruro p-anisil p nitro azul de tetrazolio
III	BSPT (Azul tiazolil)	Cloruro de (2-2'-Benzotiazolil-5-stiril-3-(4'-

TABLA 1: COMPUESTO INDICADORES DE LA PRESENCIA DE ERO ADECUADOS PARA SU USO SEGÚN LA INVENCIÓN		
		ftalhidrazidil) tetrazolio)
IV	BT también llamado Cloruro de azul de tetrazolio	Dicloruro de 2-[4-[4-(3,5-difeniltetrazol-2-io-2-il)-3-metoxifenil]-2-metoxifenil]-3,5-difeniltetrazol-2-io
V	BTSPT	Cloruro de 2-(2'-Benzotiazolil)-5-stiril-3-(4'-ftalhidrazidil)- tetrazolio
VI	CTC	Cloruro de 5-Ciano-2,3-ditolil tetrazolio
VII	DMDPT	bromuro de [3-4,s-Dimetiyltiazol-2-i1)-2,5-difenil]tetrazolio o bromuro de 1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
VIII	DSNBT (Cloruro de distirilnitroazul de tetrazolio)	
IX	(1H)-tetrazol	
X	IDNTT Cloruro de yodonitrotetrazolio	Cloruro 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazol-2-io
XI	INT, (Cloruro de Nitro Tetrazolio Violeta)	p-yodo violeta nitrotetrazolio (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio
XII	INpT	Cloruro de 2-(p-iodofenil)-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio
XIII	Mnbt (Cloruro de m-Nitro azul Tetrazolio)	
XIV	mNNT (Cloruro de m-Nitro Neotetrazolio)	
XV	MNSTC	2,2-bis(2-metoxil-4-nitro-5-sulfofeni1)-2H-tetrazolio-5-carboxanilo
XVI	MTS	Sal de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofeni1)-2H-

TABLA 1: COMPUESTO INDICADORES DE LA PRESENCIA DE ERO ADECUADOS PARA SU USO SEGÚN LA INVENCIÓN		
		tetrazolio
XVII	MTT (Bromuro de tetrazolio o bromuro de tiazolil azul tetrazolio)	Bromuro de 3+4,5-dimetiltiazol-2-il-2,s-difeniltetrazolio
XVIII	NBMT (Cloruro de Nitro azul Monotetrazolio)	
XIX	NBT (p-Nitro Blue Tetrazolium Chlorid o cloruro de Nitro azul tetrazolio)	Cloruro de (2,2'-di-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3´dimetoxi-4,4'-difenilene)ditetrazolio
XX	NT (Cloruro de Neotetrazolio)	Cloruro de 2,2',5,5'-Tetrafenil-3,3´(p-difeni1ene)-ditetrazolio
XXI	NTV (Violeta de Nitrotetrazolio)	
XXII	Azul tiazolil	Bromuro de 2-(3,5-difeniltetrazol-2-ium-2-il)-4,5-dimetil-1,3-tiazol
XXIII	TB (Cloruro de azul de tetrazolio)	Dicloruro de [(3,3´-dimetoxi (1,1´bifenil)-4,4´dilil]- bis (2,5 difenil-2H-tetrazo1io)
XXIV	oTTR (o-Tolil Rojo Tetrazolio)	Cloruro de 2-(2-metilfenil)-3,5-difeniltetrazol-2-ium
XXV	PCTMB	sodium 3'-[l-[(fenilamino)-carbonil]-3,4-tetrazolio bis(4-metoxi-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate
XXVI	PNBT (Cloruro de p-Nitro Azul de Tetrazolio)	2-[2-metoxi-4-[3-metoxi-4-[3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolidin-2-il]fenil]fenil]-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolidine
XXVII	PTB (Piperonil azul tetrazolio)	

TABLA 1: COMPUESTO INDICADORES DE LA PRESENCIA DE ERO ADECUADOS PARA SU USO SEGÚN LA INVENCIÓN		
XXVIII	pTTR (Rojo p-Tolil Tetrazolio)	Cloruro de 2-(4-metilfenil)-3,5-difeniltetrazol-2-ium
XXIX	TC-NBT (Cloruro de Tiocarbamil nitro azul tetrazolio)	Cloruro de (2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-di-p-tiocarbamilfenil-3,3´[3,3´dimetoxi-4,4´-bifenilene]-ditetrazolio
XXX	TNBT (Cloruro de Tetranitroazul tetrazolio)	2-[4-[4-[3,5-bis(4-nitrofenil)tetrazol-2-ium-Dicloruro 2-il]-3-metoxifenil]-2-metoxifenil]-3,5-bis(4-nitrofenil)tetrazol-2-ium
XXXI	TPTT (1,3,5-trifeniltetrazolio)	
XXXII	TR (TTC o TPT o Rojo tetrazolio)	Cloruro 2,3, 5-trifeniltetrazolio
XXXIII	TV (Tetrazolio violeta o Violeta Tetrazolio)	Tetrazolicloruro 2,3,5-Trifenil-2-H-, Cloruro 2,5-difenil-3-[alfa.-naftil]-tetrazolio, cloruro 2,5-difenil-3-[l-naftil]-2H-tetrasolio
XXXIV	VTB (Veratril azul tetrazolio)	
XXXV	WST-1	Disulfonato 4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]- 1,3-benzeno
XXXVI	XTT	2,2-bis(2-metoxil-4-notro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido

En la etapa b) del primer método de la invención, las mezcla obtenida en el paso a) se mantiene durante el tiempo suficiente para que el compuesto indicador de la presencia de ERO se transforme en un compuesto detectable en aquellas células que contengan dichas ERO. En el caso de que el agente indicador de la presencia de ERO sea NBT, la etapa b) se lleva a cabo durante el tiempo necesario para que dicho NBT se reduzca para dar lugar a formazan. Dicho proceso puede monitorizarse convenientemente mediante la detección de la absorbancia a 630 nm. En una forma preferida de realización, la

reacción se mantiene al menos durante 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 60 minutos o al menos durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 20 horas. La temperatura de reacción es típicamente de 37ºC, aunque puede llevarse a cabo a temperaturas de entre 20-45 ºC, preferiblemente, 25-40ºC, aún más preferiblemente entre 30-40ºC.

En una forma preferida de realización, el primer método de la invención comprende una etapa adicional (etapa b2) tras la etapa b) en donde se determina la concentración del compuesto detectable en la muestra en donde un aumento de la concentración de dicho compuesto con respecto a una muestra de referencia es indicativo de la presencia de especies reactivas de oxígeno en dicha población celular. De esta forma, además de la identificación directa del número de células que comprenden el compuesto detectable se obtienen un valor de absorbancia que es indicativo de la presencia de especies reactivas de oxígeno en dicha población celular.

El experto en la materia apreciará que la determinación de la concentración del compuesto detectable puede hacerse de forma absoluta. i.e. determinado la concentración del compuesto en la muestra o de forma relativa, i.e. determinando la relación entre la concentración del compuesto detectable en la muestra y en la muestra de referencia.

En una forma preferida de realización, el compuesto detectable es un compuesto coloreado, por lo que la concentración de dicho compuesto se mide mediante la determinación de la absorbancia de dicho compuesto a la longitud de onda adecuada.
Por "absorbancia" o densidad óptica según se emplea en la presente invención se refiere a la proporción de luz incidente que es absorbida por una sustancia. La absorbancia de una muestra puede determinarse, por ejemplo, mediante un espectofotómetro. En una forma preferida de realización, el compuesto indicador de ERO es NBT, en cuyo caso la determinación de la concetración del compuesto se lleva a cabo mediante medida de la absorbancia de la muestra en la etapa b2) a 630 nm.

Por muestra de referencia se entiende una población celular que carece de ERO o que ha sido tratada para eliminar los ERO. En una forma preferida de realización, cuando la

población celular que es objeto de estudio es una población de espermatozoides, es posible usar como muestra de referencia una población de espermatozoides de un sujeto fértil. Por sujeto fértil se entiende a un sujeto cuyos espermatozoides son capaces de fecundar un ovocito. Los criterios de la OMS para considerar a un sujeto fértil es de una cantidad de 10 millones de espermatozoides móviles por mililitro de semen.

En una forma preferida de realización, el método de la invención incluye una etapa adicional tras la etapa b) (etapa b3), que puede llevarse a cabo en paralelo con la etapa b2) para determinar la presencia de fragmentación de ADN y que comprende incubar una muestra de la mezcla de la etapa b) en condiciones adecuadas para que se produzca la desnaturalización del ADN y determinar la aparición de halos en torno a la cabeza del espermatozoide, en donde la presencia de halos inferiores a un determinado valor umbral es indicativo de que los espermatozoides presentan fragmentación de ADN.

La detección de la presencia de halos en torno a la cabeza de los espermatozoides se puede llevar a cabo esencialmente mediante la puesta en contacto de una fracción de las células de la muestra con una solución ácida y con una solución de lisis. El tratamiento con la solución ácida desnaturaliza el ADN. A continuación se trata con una solución de lisis que elimina la mayoría de las proteínas nucleares. Tras este tratamiento, los espermatozoides con ADN fragmentado no muestran halos, mientras que aquellos espermatozoides en los que el ADN está intacto desarrollan halos grandes alrededor del nucleoide.

El término “solución ácida”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier solución, suspensión, emulsión u otro fluido que contiene un compuesto que actúa como un donante de grupos H+. En una forma preferida de realización, la solución ácida puede contener un ácido seleccionado del grupo ácido clorhídrico, acético, nítrico o mezclas de éstos, entre otros. En una forma de realización aún más preferida, la solución ácida contiene ácido clorhídrico entre 0.04 y 0.08 M.

El término “solución de lisis”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier solución, suspensión, emulsión u otro fluido que es capaz de causar la lisis de

las células que se han puesto en contacto con dicha solución. La solución de lisis puede contener al menos un detergente, al menos un agente caotrópico y/o al menos un agente reductor. Detergentes adecuados para su uso en la solución desnaturalizante incluyen, sin limitación, detergentes aniónicos (por ejemplo, lauril sulfato sódico, lauril sulfato amónico), detergentes catiónicos (bromuro de cetil trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio y similares), detergentes zwiteriónicos (por ejemplo, CHAPS, lecitinas) o no iónicos (cetil alcoholo, estearil alcohol, oleil alcohol, decil glucósido, lauril glucósido, octil glucósido, Tritio X-100). En una forma preferida de realización, el detergente que forma parte de la solución de lisis es Triton X-100. En una forma de realización aún más preferida, el detergente que forma parte de la solución de lisis es lauril sulfato sódico (SDS), preferiblemente al 1%.

Agentes caotrópicos para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, urea (típicamente a una concentración de 6-8M), thiourea (típicamente a una concentración de al menos 2 M), cloruro de guanidinio (típicamente a una concentración de al menos 6 M) y perclorato de litio (típicamente a una concentración de al menos 4.5 M).

Agentes reductores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, beta-mercaptoetanol, ditiotreitol y tris(2-carboxietil)fosfine. En una forma preferida de realización, el agente reductor es ditiotreitol, preferiblemente al 0.8M.

En una forma preferida de realización, el método analítico se lleva a cabo tal y como ha sido descrito por Fernández JL. et al, (Fertil. Steril. 2005; 84:860) y consiste en sumergir los espermatozoides procedentes de muestras frescas, congeladas o diluidas en un gel de agarosa cuyo soporte lo constituye un portaobjetos pretratado y en donde la muestra se trata de forma secuencial con una solución ácida desnaturalizante (0.08 N HCl), una primera solución de lisis neutralizante (0.4 M Tris, 0.8 M DTT, 1% SDS, and 50 mM EDTA, pH 7.5), una segunda solución de lisis neutralizante (0.4 M Tris, 2 M NaCl, and 1% SDS, pH 7.5). La detección de los halos de ADN se lleva a cabo de forma visual tras la tinción de los espermatozoides con una sonda de ADN, preferiblemente una sonda fluorescente y, aún más preferiblemente, DAPI).

En una forma preferida de realización, se considera que la muestra es fértil cuando al menos un 20-30% de los espermatozoides tienen un halo superior o igual a 7,5 µm. La determinación del halo se lleva a cabo típicamente mediante visualización directa de los espermatozoides mediante microscopía de contraste de fase.

Métodos para determinar si una solución es adecuada para su uso en el tratamiento ácido de la presente invención comprenden analizar si dicha solución es capaz de desnaturalizar el ADN. Dicha capacidad puede analizarse empleando diversas técnicas conocidas en el estado de la técnica, como el incremento de la absorbancia a 260 nm, entre otros.

Métodos para determinar si una solución de lisis es adecuada para su uso en la presente invención comprenden analizar la capacidad de dicha solución de eliminar las proteínas nucleares del ADN. Dicha capacidad puede analizarse empleando diversas técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica entre las que se encuentran huella de DNAasa I, ensayo de cambio de movilidad en gel, ensayo de unión a nitrocelulosa, western blot, entre otros.

La etapa c) del primer método de la invención comprende colocar la mezcla obtenida en b) con un agente gelificante sobre un soporte sólido en condiciones adecuadas para que se produzca la gelificación del agente gelificante.

Por "agente gelificante" se entiende aquella sustancia que permite la coagulación en masa de una solución coloidal por formación de una red sólida extremadamente fina que contiene un líquido en sus mallas.

En una forma preferida de realización, el compuesto espesante usado en la etapa a) del primer método de la invención es a la vez un compuesto gelificante, de forma que la etapa c) no requiere de la adición de un compuesto gelificante sino simplemente de un cambio de condiciones de forma que el compuesto espesante/gelificante gelifique de forma que se inmovilice las células de la población celular.

Agentes gelificantes y que aumentan la viscosidad que se pueden emplear en la presente invención se seleccionan de la Tabla 2.

TABLA 2: COMPUESTOS GELIFICANTES Y QUE AUMENTAN LA VISCOSIDAD ADECUADOS PARA SU USO SEGÚN LA INVENCIÓN.	
I	Agarosa, polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae principalmente de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*.
II	Acido algínico, producto obtenido a partir de distintos tipos de algas,entre ellas *Macrocystis, Fucus, Laminaria.*
III	Alginato y sus derivados entre los que destacan alginato sódico, potásico, amónico, cálcico, de propilnenglicol.
IV	Agar-agar, extraído de varios tipos de algas rojas, entre ellas del género *Gellidium.*
V	Carragenanos, producto obtenido de varios tipos de algas *Gigartina, Chondrus*, *Furcellaria* y otras.
VI	Goma garrofín, producto extraído de las semillas de *Ceratonia siliqua*
VII	Goma guar extraída de *Cyamopsis tetragonolobus*
VIII	Goma tragacanto, producto exudado del árbol *Astrogalus gummifer*
IX	Goma arábiga, producto exudado del árbol *Acacia senegalia*
X	Goma xantana, producido por *Xanthomonas campestris*
XI	Goma karaya, producto exudado del árbol *Sterculia urens*
XII	Goma tara, extraída de la semilla de *Caesalpinia spinosa*
XIII	Goma gellan, producido por *Pseudomonas elodea*
XIV	Sorbitol y jarabe de sorbitol
XV	Manitol
XVI	Ésteres de ácidos grasos y sorbitano, entre los que destacan Monolaurato de sorbitán polioxietilenado, Monooleato de sorbitán polioxietilenado, Monopalmitato de sorbitán polioxietilenado, Monoestearato de sorbitán polioxietilenado, Triestearato de sorbitán polioxietilenado
XVII	Pectina, constituyente mayoritario de las paredes celulares vegetales
XVIII	Fosfátidos de amonio

TABLA 2: COMPUESTOS GELIFICANTES Y QUE AUMENTAN LA VISCOSIDAD ADECUADOS PARA SU USO SEGÚN LA INVENCIÓN.	
XIX	Acetato isobutirato de sacarosa
XX	Esteres glicéridos de colofonia de madera
XXI	Celulosa y derivados, entre los que destacan Celulosa microcristalina, Metilcelulosa, Hidroxipropilcelulosa,Hidroxipropilmetilcelulosa,

El experto en la materia apreciará que las condiciones adecuadas para la gelificación del agente espesante dependerán de la naturaleza de éste. Así, en el caso preferido de que se usa agarosa como agente espesante en la etapa a) y como agente gelificante en la etapa c), es suficiente con disminuir la temperatura por debajo de la temperatura de gelificación de la agarosa a la concentración a la que ésta se encuentra. Dicha temperatura puede determinarse fácilmente por el experto en la materia a partir de tablas en las que se correlaciona la temperatura de gelificación de la agarosa con la concentración en la muestra (por ejemplo, la tabla disponible en http://www.lonzabio.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Appendix_B_-_Agarose_Physical_Chemistry.pdf). En una forma preferida de realización el agente espesante/gelificante es una agarosa de bajo punto de fusión.

Agarosas de bajo punto de fusión se encuentran disponibles comercialmente tales como Ultra Pure(R) agarose (Invitrogen), NuSieve(R) GTG(R) Agarosa (Lopza), LM Agarosa y LM Sieve (Pronadisa), Agarosa SERVA Premium (Serva) y similares. En el caso de que el agente gelificante sea agarosa, la etapa c) se lleva a cabo llevando la temperatura de la mezcla a 10-30ºc, preferiblemente 15-25ºC, aún más preferiblemente 20-25ºC.

En el caso de que el agente gelificante sea alginato, la gelificación se induce mediante la adición al medio de iones calcio.

Por “soporte sólido” según se emplea en la invención se refiere a una superficie de cristal, plástico, cerámica o metal entre otros, que permita contener la mezcla de la invención que contiene el agente gelificante. Según el método empleado en la

cuantificación de las células será necesario que dicho soporte deje pasar la luz. Preferiblemente el soporte sólido es un portaobjetos.

En una forma preferida de realización, la etapa c) se lleva a cabo usando agarosa a una concentración del 0,5-5%, en cuyo caso la gelificación se lleva a cabo directamente sobre el portaobjetos mediante la aplicación de la mezcla obtenida en la etapa b) a un portaobjetos e incubación a temperatura ambiente.

Por último, la etapa d) del primer método de la invención comprende identificar aquellas células en las que aparece el compuesto detectable, de forma que dichas células serán aquellas que contienen ERO. En una forma preferida de realización, las células que comprenden el compuesto detectable resultante de la conversión del indicador de ERO se detectan por observación directa mediante microscopía óptica. En el caso de que el compuesto indicador sea una sal de tetrazolio, preferentemente NBT, el compuesto detectable (precipitado de formazán) aparece un precipitado de color azul intenso localizado normalmente sobre la pieza intermedia y la cabeza del espermatozoide.

Aunque la identificación de las distintas células en la muestra se puede hacer mediante microscopía de contraste de fase, es preferible teñir las células con un colorante. Típicamente, la tinción se lleva a cabo tras la etapa de gelificación del agente gelificante. Soluciones de tinción que pueden emplearse para la realización de la presente invención incluyen, sin limitación, tricrómica de gomori, tricrómica de masson, verde de metileno, giemsa, Wright, hematoxilina-eosina, azul de metileno, entre otras. En una forma preferida de realización, las células se tiñen con verde de metileno.

Segundo método de la invención

Los autores de la presente invención han puesto a punto un método para determinar la necesidad de una terapia antioxidante de un paciente que comprende determinar la presencia en una muestra de semen de dicho sujeto de células que contienen ERO usando un método de la invención, y el porcentaje de células que presentan

fragmentación de ADN usando un método de la invención en donde si el porcentaje de células que comprenden ERO y el porcentaje de células que presentan fragmentación de ADN es superior a dichos porcentajes en una muestra de referencia es indicativo de que dicho paciente debería ser tratado con una terapia antioxidante.

Por "terapia antioxidante" según se emplea en la presente invención se refiere a la administración de agentes antioxidantes para el tratamiento de una enfermedad. Por "agente antioxidante" se entiende a todos aquellos elementos que tienen como función eliminar del organismo los radicales libres. Diversos estudios han demostrado el efecto del tratamiento con agentes antioxidantes en la reducción de la fragmentación del ADN de los espermatozoides (Greco E. et al, J Androl. 2005, 26:349-53). Entre los tratamientos antioxidantes que pueden administrarse a pacientes que presentan alto porcentaje de células que comprenden ERO y fragmentación de ADN espermático destacan la administración en las dosis adecuadas de Vitamina E, C, L-Carnitina, beta-caroteno, flavonoides, licopeno, cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio entre otros.

Según se usa aquí, el término "determinación", se refiere a la determinación de la probabilidad de que el paciente necesite recibir una terapia antioxidante. Como entenderán los expertos en la materia, la predicción de la necesidad de dicha terapia antioxidante, aunque se prefiere que sea, no necesita ser correcta para el 100% de los sujetos a ser diagnosticados o evaluados. El experto en la materia puede determinar fácilmente si el resultado obtenido para un sujeto es estadísticamente significativo usando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de los valores de p, prueba t de Student, prueba de Mann Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 50%, al menos del 60%, al menos del 70%, al menos del 80%, al menos del 90%, al menos del 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,2, 0,1 ó 0,05.

Por "cuantificar la proporción de células" según se emplea aquí se refiere a expresar numéricamente las células que muestran el compuesto detectable en relación a las

células que no muestran dicho compuesto. En una realización particular, dicho procedimiento se lleva a cabo mediante microscopia óptica.

Por "muestra de referencia" en el contexto de la presente invención, se entiende como la muestra biológica de un sujeto fértil o muestras anteriores del mismo individuo, que se usan para determinar la presencia de ERO.

El segundo método de la invención contempla la posibilidad de determinar la necesidad de una terapia antioxidante de un sujeto a partir de los distintos resultados que proporciona al primer método de la invención. Así, un indicativo de la existencia de la necesidad de una terapia antioxidante es la existencia de un porcentaje de células que muestran ERO superior a un determinado valor umbral. Dicho valor puede combinarse con la presencia de un porcentaje de células que no muestran halo superior a un determinado valor umbral. Así, el segundo método de la invención permite determinar la posibilidad de que un sujeto necesite una terapia antioxidante si:

- En una muestra de semen de dicho sujeto aparece un porcentaje de células que contienen ERO superior a un valor umbral. En una forma preferida de realización, el valor umbral de porcentaje de células que contienen ERO es del 20%. Alternativamente, si la muestra ha sido tratada con gradientes de Percoll, el valor umbral es de un 30% y/o
- En una muestra de semen de dicho sujeto aparece un porcentaje de células que contienen ERO superior a un valor umbral y el porcentaje de células que no muestran halo es superior a un valor umbral. En una forma preferida de realización el valor umbral de porcentaje de células que contienen ERO es del 20%. Alternativamente, si la muestra ha sido tratada con gradientes de Percoll, el valor umbral es de un 30%. En una forma preferida de realización, el valor umbral del porcentaje de células que no muestran halo es del 20%.

Valores umbrales para cada uno de los parámetros que se obtienen al aplicar las distintas realizaciones del primer método de la invención pueden determinarse a partir de una muestra de referencia.

Los términos y expresiones "célula", "población celular", "condiciones isotónicas", "agente espesante", "compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno" y "agente gelificante" han sido definidos en detalle en el contexto del primer método de la invención y se usan de igual manera en el segundo método de la invención.

Tercer método de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un método (en adelante tercer método de la invención) para identificar una sustancia (en adelante sustancia X) con capacidad de disminuir las ERO presentes en una población celular. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método (en adelante tercer método de la invención) que comprende:

a) poner en contacto dicha sustancia X con dicha población celular,
b) Poner en contacto en condiciones isotónicas dicha población celular con un agente espesante de forma que se reduzca sustancialmente la movilidad de las células de la población celular y con un compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno,
c) mantener la mezcla obtenida en el paso b) durante el tiempo suficiente para la conversión del compuesto indicador en un compuesto detectable en presencia de especies reactivas de oxígeno,
d) colocar la mezcla obtenida en c) con un agente gelificante sobre un soporte sólido en condiciones adecuadas para que se produzca la gelificación del agente gelificante y
e) cuantificar la proporción de células en las que aparece el compuesto detectable

en donde una disminución de la proporción de células que muestran un cambio en la coloración con respecto a muestra de referencia es indicativo de que la sustancia X es capaz de disminuir en dichas células la presencia de especies reactivas de oxígeno.

en donde la disminución de la proporción de células que muestran un cambio en la coloración es indicativo de que la sustancia X es capaz de disminuir en dichas células la presencia de ERO.

Un experto en la materia entenderá que en ocasiones será necesario el tratamiento previo con un agente que genere radicales libres para poder observar el efecto del compuesto antioxidante. Entre los compuestos que pueden emplearse para generar radicales libres destacan entre otros el agua oxigenada.

En una primera etapa, el tercer método de la invención comprende poner en contacto la población celular con un compuesto o preparación cuyo efecto. Por "poner en contacto" una célula con el compuesto candidato se incluye, según la presente invención, cualquier posible forma de llevar el compuesto candidato hasta el interior de la célula que expresa la construcción de ADN. Así, en caso de que el compuesto candidato sea una molécula de bajo peso molecular, es suficiente con añadir dicha molécula al medio de cultivo. En caso de que el compuesto candidato sea una molécula de alto peso molecular (por ejemplo, polímeros biológicos tales como un ácido nucleico o una proteína), es necesario aportar los medios para que esa molécula pueda acceder al interior celular. En caso de que la molécula candidata sea un ácido nucleico, pueden usarse métodos convencionales para transfección, según se ha descrito anteriormente para la introducción de la construcción de ADN. En caso de que el compuesto candidato sea una proteína, la célula puede ponerse en contacto tanto con la proteína directamente como con el ácido nucleico que la codifica acoplado a elementos que permitan su transcripción /traducción una vez que se encuentren en el interior celular. Para ello, se pueden usar cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para permitir su entrada al interior celular. Alternativamente, es posible poner en contacto la célula con una variante de la proteína que se desea estudiar que ha sido modificada con un péptido que sea capaz de promover la translocación de la proteína al interior celular, tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D.melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex y oligómeros de arginina (Lindgren, A. et al., 2000, *Trends Pharmacol.* Sci, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al. , 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393).

Preferiblemente, el compuesto a ensayar no se encuentra aislado sino que se encuentra formando parte de una mezcla más o menos compleja bien derivada de una fuente natural o bien formando parte de una biblioteca de compuestos. Ejemplos de bibliotecas de compuestos que pueden ser ensayadas según el método de la presente invención incluyen, sin limitación, bibliotecas de péptidos incluyendo tanto péptidos como análogos peptídicos que comprenden D-amino ácidos o péptidos que comprenden enlaces no peptídicos, bibliotecas de ácidos nucleicos incluyendo ácidos nucleicos con enlaces no fosfodiester del tipo de fosforotioato o ácidos nucleicos peptídicos, bibliotecas de anticuerpos, de carbohidratos, de compuestos de bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, de peptidomiméticos, y similares. En el caso de que se use una biblioteca de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, la biblioteca puede haber sido preseleccionada para que contengan compuestos que puedan acceder al interior celular con mayor facilidad. Así, los compuestos se pueden seleccionar en base a determinados parámetros tales como tamaño, lipofilicidad, hidrofilicidad, capacidad de formar puentes de hidrógeno.

Alternativamente, los compuestos a ensayar pueden estar formando parte de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser animal, vegetal obtenido de cualquier entorno, incluyendo, sin limitación, extractos de organismos terrestres, aéreos, marinos y similares.

Las etapas b) a e) coinciden esencialmente con las etapas a) a d) del primer método de la invención y los términos usados en dicho método se usan con el mismo significado en el tercer método de la invención.

En caso de que el compuesto candidato se encuentre formando parte de una mezcla de mayor o menor complejidad, la invención comprende adicionalmente una o varias etapas de fraccionamiento de dicha mezcla y la repetición de las etapas (a), (b), (c), (d) y (e) del método de la invención un número variable de veces hasta que el compuesto de la mezcla responsable de la disminución del nivel de ERO se encuentre aislado. Métodos para el fraccionamiento de compuestos presentes en una mezcla incluyen cromatografía (en capa fina, de gases o de exclusión molecular en gel, de afinidad),

cristalización, destilación, filtración, precipitación, sublimación, extracción, evaporación, centrifugación, espectrometría de masas, adsorción y similares.

En una realización particular del tercer método de la invención se incluye adicionalmente una etapa c2) que comprende determinar la concentración del compuesto detectable en la mezcla de la etapa c) y en donde una disminución de la absorbancia con respecto a una muestra de referencia es indicativo de que la sustancia X es capaz de disminuir la presencia de ERO en dicha población celular.

En otra realización particular del tercer método de la invención que comprende adicionalmente una etapa d2) que comprende incubar una muestra de la mezcla de la etapa c con una solución desnaturalizante, seguidamente con una solución de lisis y finalmente teñir dichas células en donde las células que no muestran halos de tamaño superior a un determinado valor umbral es indicativo de que dichas células presentan ADN fragmentado.

Composiciones y kits de la invención y usos diagnósticos de las mismas

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un agente gelificante y un compuesto indicador de la presencia de ERO.

El término "composición", según se usa en la presente invención, se refiere a una mezcla de dos o más componentes. En el caso de la presente invención, las composiciones de la invención contienen los reactivos necesarios para deteminar la necesidad de una terapia antioxidante de un sujeto a partir de una muestra de semen de dicho sujeto. Preferiblemente, la composición de la invención comprende un agente espesante (preferiblemente agarosa y aún más preferiblemente agarosa de bajo punto de fusión) y un indicador de ERO (preferiblemente una sal de tetrazolio y aún más preferiblemente NBT) en donde ambos componentes se encuentran formando una mezcla. En una forma preferida de realización, las composiciones de la invención comprenden agarosa a una concentración del 2% al 5% y NBT a una concentración de hasta 1 mg/ml.

Los términos “agente espesante”, “agente indicador de la presencia de ERO” y “ERO”, han sido definidos con anterioridad en el contexto del primer método de la invención.

En una forma preferida de realización, el compuesto espesante es, además un compuesto gelificante, el compuesto espesante/gelificante es agarosa y la agarosa es agarosa de bajo punto de fusión.

En otra forma preferida de realización, el compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno es una sal de tetrazolio y, de forma aún más preferida, es NBT.

En otra forma preferida de realización de la composición de la invención, el compuesto espesante es agarosa de bajo punto de fusión, el compuesto indicador de ERO es NBT, la agarosa se encuentra a una concentración del 2% al 5% y el NBT se encuentra a una concentración de hasta 1 mg/ml.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende un agente gelificante, un compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno, una solución ácida y una solución de lisis. Los términos “solución ácida” y “solución de lisis” se han explicado en detalle en el contexto del primer método de la invención y se aplican de igual manera al kit de la invención. En una forma preferida de realización, el kit de la invención comprende, adicionalmente, una sonda para la detección de ADN, prefereiblemente una sonda fluorescente (bromuro de etidio, naranja de acridina, ioduro de propidio, ToPro-3, DAPI) y, aún más preferiblemente, DAPI.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de una composición o de un kit que comprende un agente gelificante y un compuesto con capacidad de formar un producto detectable en presencia de ERO para determinar la presencia de ERO en una población celular.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de una composición o de un kit que comprende un agente gelificante y un compuesto con capacidad de formar un producto detectable en presencia de ERO para determinar la necesidad de una terapia antioxidante de un sujeto masculino.

El término "kit", según se usa en la presente invención, se refiere a una combinación de artículos que facilitan la puesta en práctica de un proceso, método, ensayo, análisis o manipulación de una muestra. En el caso de la presente invención, los kits de la invención contienen los reactivos necesarios para determinar la necesidad de una terapia antioxidante de un sujeto a partir de una muestra de semen de ducho sujeto. Preferiblemente, el kit de la invención comprende un agente espesante (preferiblemente agarosa y aún más preferiblemente agarosa de bajo punto de fusión) y un indicador de ERO (preferiblemente una sal de tetrazolio y aún más preferiblemente NBT) en donde ambos componentes se encuentran en un mismo contenedor o en contenedores separados. Componentes adicionales que pueden formar parte del kit de la invención incluyen:

- Reactivos adecuados para provocar la desnaturalización del ADN (soluciones ácidas) y la reactivos para eliminar las proteínas nucleares (solución de lisis).
- Reactivos adecuados para la tinción de los espermatozoides, preferiblemente verde de metileno.

Los términos "agente espesante", "agente gelificante", "ERO" y "compuesto con capacidad de formar un producto detectable en presencia de ERO" se han definido anteriormente.

La invención se describe ahora en detalle por medio de los siguientes ejemplos que se deben considerar como meramente ilustrativos y no limitantes del ámbito de la invención.

EJEMPLO 1

El método de la presente invención para determinar la presencia de ERO en una población celular es un método indirecto que ha sido correlacionado con otras metodologías basadas en quimioluminiscencia (Esfandiari N. et al., J Androl. 2003 Nov-Dec;24(6):862-70). Tiene como principales ventajas que es muy económico y tan solo requiere de un microscopio óptico.

Preparación de reactivos

El NBT es una sal amarilla soluble en agua que reacciona en presencia de aniones superóxido dentro de las células produciendo un precipitado azul de diformazán. La cantidad de cristales de diformazán presentes en las células refleja la producción por parte de estas células de ion superóxido.

Para realizar el método de la invención, en primer lugar se preparó una mezcla de agarosas con NBT (agarosas-NBT). Para ello se disolvieron 10 mg de NBT (Sigma N5514-10 tab) en 10 ml de agua destilada y se mantuvo la solución a 37ºC. Aparte, se disolvió una cantidad de agarosa de bajo punto de fusión en PBS a pH 7 entre el 2% y el 5% y se dejó sobre una placa calefactora a 37º para evitar que gelificara. Seguidamente se mezclaron en volúmenes iguales las dos disoluciones y se repartió en volúmenes de 100 µl en tubos eppendorff. La mezcla resultante es estable entre 2 ºC y 22 ºC.

Reacción NBT

La muestra de semen se diluyó en PBS a una concentración de entre 5-10 millones de espermatozoides por mililitro. Las agarosas-NBT se colocaron en un flotador e incubaron durante 5 minutos en un baño entre 90-100ºC hasta que las agarosas se disolvieron. De modo alternativo podría utilizarse un microondas para fundir la agarosa. A continuación los tubos se transfirieron a un baño a 37 ºC y se dejaron atemperar durante 5 minutos. Un volumen de semen (con la concentración ajustada) se mezcló con un volumen igual de agarosa y homogenizó con la ayuda de una micropipeta. La mezcla se incubó a 37ºC durante 45 minutos. Con este tiempo, se produce el máximo de producto precipitado (diformazán). Durante el periodo de incubación es posible coger

un volumen de 25 µl para determinar la fragmentación del ADN según el kit Halosperm (Halotech, S.L; Madrid).

Durante la incubación la mezcla puede adquirir una coloración azulada cuya intensidad dependerá de la presencia de ión superóxido, tanto en espermatozoides y en leucocitos presentes como en el plasma seminal. La intensidad de la coloración puede determinarse midiendo la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro, citómetro o en un lector de placas. Este cambio de coloración supone un primer indicio de la presencia de estrés oxidativo o déficit en la capacidad detoxificante de la muestra.

Para determinar el porcentaje de espermatozoides o células presentes en la muestra que están produciendo ERO se cogieron 10 µl de muestra al final de la incubación y se colocaron sobre un portaobjetos previamente tratado. Se colocó un cubreobjetos para permitir que la agarosa se extendiera y se dejó gelificar a 4ºC durante cinco minutos. Pasado este tiempo se retiró con suavidad el cubre y se dejó secar la agarosa al aire.

A continuación se tiñó con una solución de verde metileno durante 5 minutos. Para preparar dicha solución se pesó 0.15 gr de verde metileno (Sigma s580104 50mg) y se disolvió en 50 ml de agua destilada, se añadió 25 µl de acido acético glacial y se agitó. Tras incubar las muestras con la solución de tinción, se lavaron en agua corriente y se dejaron secar al aire. Se conserva a temperatura ambiente.

Por último, se montaron con DPX y se analizaron por observación directa al microscopio óptico 200 espermatozoides, determinando la proporción de células que presentan ERO.

Cuando se realiza el ensayo en ausencia de agarosa, los espermatozoides sedimentan o pueden interactuar físicamente con otros espermatozoides. El contacto de los espermatozoides que presentan ERO con los que no los presentan podría desencadena la producción de difarmazán en los que en principio no están produciendo especies reactivas de oxigeno y además se dificulta la cuantificación por microscopía óptica (Figura 1).

La incorporación de agarosa en concentraciones adecuadas evita la sedimentación y el contacto no deseado entre espermatozoides que podrían artefactuar los resultados.

Así, cuando se emplea agarosa-NBT, en los espermatozoides NBT positivos, que presentan ERO, se observaba unos precipitados azul oscuros situados principalmente en la zona intermedia y la cabeza del espermatozoide (Figura 2).

En los espermatozoides NBT negativos, no se observan dichos precipitados (Figura 3)

Al final del proceso, se obtiene la siguiente información: 1) un valor de la fragmentación del ADN espermático, 2) la proporción de espermatozoides NBT positivos y 3) un cambio de coloración de la muestra que representa un valor cualitativo (negativo, leve, moderado, intenso) o cuantitativo (tras medir su absorbancia) que se podrá comparar con el de una muestra de referencia.

EJEMPLO 2

Estudio comparativo de las agarosas del kit Halosperm y las agarosas modificadas con NBT

La incorporación de agarosas modificadas con NBT para la determinación de la presencia de ERO en muestras de semen, no debería afectar la eficacia del test de fragmentación del kit comercial Halosperm. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de las agarosas-NBT sobre el resultado del test de fragmentación del kit halospem.

Para ello, se analizaron 8 muestras de semen diferentes de pacientes con infertilidad y que tenían un seminograma alterado. Las variables de estudio fueron SDF (siglas en inglés de sperm DNA fragmentation) que determina el porcentaje de espermatozoides con el ADN fragmentado y DS (siglas del inglés degraded sperm) que indica el porcentaje de espermatozoides degradados.

Se analizaron 8 muestras de semen de diferentes pacientes que mostraban un seminograma alterado.

A continuación, se analizaron los datos estadísticamente. En la Tabla 3, se muestra la estadística descriptiva de las muestras para las variables SDF y DS.

Tabla 3. Estadística descriptiva de las muestras

	Tipo			Estadístico	Error típ.
SDF	**Agarosas normales**	Media		34,1875	5,77397
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	20,5342	
			Límite superior	47,8408	
		Media recortada al 5%		34,2083	
		Mediana		35,5000	
		Varianza		266,710	
		Desv. Típ.		16,33125	
		Mínimo		11,50	
		Máximo		56,50	
		Rango		45,00	
		Amplitud intercuartil		31,63	
		Asimetría		-,217	,752
		Curtosis		-1,197	1,481
	Modificadas-NBT	Media		31,1250	6,41757
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	15,9498	
			Límite superior	46,3002	
		Media recortada al 5%		30,2778	
		Mediana		23,7500	
		Varianza		329,482	
		Desv. típ.		18,15164	
		Mínimo		11,50	
		Máximo		66,00	
		Rango		54,50	
		Amplitud intercuartil		25,50	
		Asimetría		1,077	,752
		Curtosis		,559	1,481
DS	**Agarosas normales**	Media		14,0000	5,09814
		Intervalo de	Límite inferior	1,9448	

	confianza para la media al 95% Límite superior	26,0552	
	Media recortada al 5%	13,1389	
	Mediana	9,0000	
	Varianza	207,929	
	Desv. típ.	14,41973	
	Mínimo	1,00	
	Máximo	42,50	
	Rango	41,50	
	Amplitud intercuartil	20,38	
	Asimetría	1,192	,752
	Curtosis	,944	1,481
Modificadas-NBT	Media	11,3125	3,62892
	Intervalo de confianza para la media al 95% Límite inferior	2,7315	
	Límite superior	19,8935	
	Media recortada al 5%	11,0139	
	Mediana	9,7500	
	Varianza	105,353	
	Desv. típ.	10,26415	
	Mínimo	,00	
	Máximo	28,00	
	Rango	28,00	
	Amplitud intercuartil	18,75	
	Asimetría	,495	,752
	Curtosis	-1,141	1,481

A continuación, para verificar el ajuste de los datos a una distribución de probabilidad se realizaron dos pruebas no paramétricas, concretamente la prueba de Kolgomorov-Smirnov y la prueba Shapiro Wilk, datos mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Estudios de normalidad de las variables SDF y DS

		Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	tipo	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
SDF	agarosas normales	,147	8	,200	,951	8	,721
	modificadas	,236	8	,200	,896	8	,263
DS	agarosas normales	,222	8	,200	,860	8	,121
	modificadas	,180	8	,200	,927	8	,491

SDF: Fragmentación de ADN de espermatozoides, DS: Espermatozoides degradados, gl: grados de libertad, Sig: significancia.

Uno de los pasos previos a la comprobación de si existen diferencias entre las medias de varias muestras es determinar si las varianzas en tales muestras son iguales. Tras la realización de la Prueba de Levene, se aceptó que tanto para la variable SDF (Tabla 5 y Figura 4), como para la variable DS (Tabla 6 y Figura 5) las varianzas eran iguales y tras ellos que las medias eran iguales.

Tabla 5. Resultados del test para la variable SDF.

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
									95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	Superior	Inferior
DS	Se han asumido varianzas iguales	,821	,380	,429	14	,674	2,68750	6,25781	-10,73416	16,10916
	No se han asumido varianzas iguales			,429	12,644	,675	2,68750	6,25781	-10,87042	16,24542

Tabla 6. Resultados del test para la variable DS

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
									95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	Superior	Inferior
DS	Se han asumido varianzas iguales	,821	,380	,429	14	,674	2,68750	6,25781	-10,73416	16,10916
	No se han asumido varianzas iguales			,429	12,644	,675	2,68750	6,25781	-10,87042	16,24542

Por tanto, se concluyo que la agarosa NBT empleada en el método de la presente invención es compatible con la agarosa del kit halosperm para la determinación del ADN espermático y al tratarse de dos variables relacionadas, fragmentación y estrés oxidativo, la optimización de este método podría representar una cómoda presentación

que permitiría determinar simultáneamente fragmentación del ADN espermático y estrés oxidativo a partir de un pequeño volumen de muestra de semen con un coste económico muy reducido.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la presencia de células que contienen especies reactivas de oxígeno en una población celular que comprende:
   a) Poner en contacto en condiciones isotónicas dicha población celular con un agente espesante de forma que se reduzca sustancialmente la movilidad de las células de la población celular y con un compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno,
   b) mantener la mezcla obtenida en el paso a) durante el tiempo suficiente para la conversión del compuesto indicador en un compuesto detectable en aquellas células que contengan especies reactivas de oxígeno,
   c) colocar la mezcla obtenida en b) con un agente gelificante sobre un soporte sólido en condiciones adecuadas para que se produzca la gelificación del agente gelificante y
   d) identificar aquellas células en las que aparece el compuesto detectable

   en donde la presencia del compuesto detectable en una célula es indicativo de la presencia en dicha célula de especies reactivas de oxígeno.

2. Método según la reivindicación 1 que incluye adicionalmente una etapa b2) que comprende determinar la concentración del compuesto detectable en la muestra obtenida tras la etapa b) en donde un aumento de la concentración de dicho compuesto con respecto a una muestra de referencia es indicativo de la presencia de especies reactivas de oxígeno en dicha población celular.

3. Método según las reivindicaciones 1 o 2 que comprende adicionalmente una etapa c2) que comprende incubar una muestra de la mezcla de la etapa b en condiciones adecuadas para que se produzca la rotura del espermatozoide y detectar la formación de halos en torno a la cabeza del espermatozoide, en donde la presencia de halos superiores a un determinado valor umbral es indicativo de que dichas células presentan ADN intacto.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que incluye una etapa adicional c3) que comprende teñir las células de la etapa c).

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el agente que espesante usado en la etapa a) y el agente gelificante usado en la etapa c) es el mismo compuesto.

6. Método según la reivindicación 5 en donde el agente espesante y el agente espesante es agarosa.

7. Método según la reivindicación 6 en donde la concentración final de agarosa es del 1 al 2,5 % y la etapa b se lleva a cabo durante 45 minutos a 37 ºC.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el compuesto que en presencia de especies reactivas de oxígeno sufre un cambio en sus propiedades de manera que es detectable es una sal de tetrazolio.

9. Método según la reivindicación 8 en donde el compuesto indicador es nitroazul de tetrazolio.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde la etapa d) se lleva a cabo por observación directa mediante microscopía óptica.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde la población celular es una población de espermatozoides.

12. Método según la reivindicación 11 en donde la población celular se encuentra formando parte de una muestra de semen.

13. Método para determinar la necesidad de una terapia antioxidante de un paciente que comprende determinar la presencia en una muestra de semen de dicho sujeto de células que contienen ERO usando un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y el porcentaje de células que presentan fragmentación de ADN usando un método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12 en donde si el porcentaje de células que comprenden ERO y el porcentaje de células que presentan fragmentación de ADN son superiores a dichos porcentajes en una muestra de referencia es indicativo de que dicho paciente debería ser tratado con una terapia antioxidante.

14. Método según la reivindicación 13 en donde la muestra es una muestra de semen.

15. Método para identificar una sustancia X con capacidad de disminuir las especies reactivas de oxígeno presentes en una población celular que comprende:
    a) poner en contacto dicha sustancia con dicha población celular,
    b) Poner en contacto en condiciones isotónicas dicha muestra biológica con un agente espesante de forma que se reduzca sustancialmente la movilidad de las células de la población celular y con un compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno,
    c) mantener la mezcla obtenida en el paso b) durante el tiempo suficiente para la conversión del compuesto indicador en un compuesto detectable en presencia de especies reactivas de oxígeno,
    d) colocar la mezcla obtenida en c) con un agente gelificante sobre un soporte sólido en condiciones adecuadas para que se produzca la gelificación del agente gelificante y
    e) cuantificar la proporción de células en las que aparece el compuesto detectable

    en donde una disminución de la proporción de células que muestran un cambio en la coloración con respecto a muestra de referencia es indicativo de que la sustancia X es capaz de disminuir en dichas células la presencia de especies reactivas de oxígeno.

16. Método según la reivindicación 15 que incluye adicionalmente una etapa c2) que comprende determinar la concentración del compuesto detectable en la muestra obtenida tras la etapa c) en donde una disminución de la concentración con respecto a una muestra de referencia es indicativo de que la sustancia X es capaz de disminuir la presencia de especies reactivas de oxígeno en dicha población celular.

17. Método según la reivindicación 15 o 16 que comprende adicionalmente una etapa d2) que comprende incubar una muestra de la mezcla de la etapa c con una solución desnaturalizante, seguidamente con una solución de lisis y finalmente

teñir dichas células en donde las células que no muestran halos es indicativo de que dichas células presentan ADN fragmentado.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 que incluye una etapa adicional d3) que comprende teñir las células de la etapa d.

19. Método según la reivindicación 15 a 18 en donde el compuesto espesante y el agente gelificante es el mismo compuesto.

20. Método según la reivindicación 19 en donde el compuesto espesante y el agente gelificante es agarosa.

21. Método según la reivindicación 20 en donde la concentración final de agarosa es del 1 al 2,5 % y etapa c se lleva a cabo durante 45 minutos a 37 ºC.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21 en donde el compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno es una sal de tetrazolio.

23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22 en donde el compuesto que en presencia de especies reactivas de oxígeno sufre un cambio en sus propiedades de manera que es detectable es nitroazul de tetrazolio.

24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23 en donde la cuantificación se lleva a cabo por observación directa mediante microscopía óptica.

25. Composición que comprende un agente espesante y un compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno.

26. Composición según la reivindicación 25 en donde el compuesto espesante es, además un compuesto gelificante.

27. Composición según la reivindicación 26 en donde el compuesto espesante/gelificante es agarosa.

28. Composición según la reivindicación 27 en donde la agarosa es agarosa de bajo punto de fusión.

29. Composición según cualquiera de las la reivindicaciones 25 a 28 en donde el compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno es una sal de tetrazolio.

30. Composición según la reivindicación 29 en donde la sal de tetrazolio es NBT.

31. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30 en donde el compuesto espesante es agarosa de bajo punto de fusión, el compuesto indicador de ERO es NBT, la agarosa se encuentra a una concentración del 2% al 5% y el NBT se encuentra a una concentración de 1 mg/ml.

32. Kit que comprende un agente espesante, un compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno, una solución ácida que desnaturalice el ADN y una solución de lisis que elimine las proteínas nucleares.

33. Kit según la reivindicación 32 en donde el compuesto espesante es, además un compuesto gelificante.

34. Kit según la reivindicación 33 en donde el compuesto espesante/gelificante es agarosa.

35. Kit según la reivindicación 34 en donde la agarosa es agarosa de bajo punto de fusión.

36. Kit según cualquiera de las la reivindicaciones 32 a 35 en donde el compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno es una sal de tetrazolio.

37. Kit según la reivindicación 36 en donde la sal de tetrazolio es NBT.

38. Uso de una composición o de un kit que comprende un agente espesante y un compuesto indicador de la presencia de ERO para determinar la presencia de especies reactivas de oxígeno en una población celular.

39. Uso de un kit que comprende un agente espesante, un compuesto indicador de la presencia de ERO, una solución ácida desnaturalice el ADN y una solución de

lisis que elimine las proteínas nucleares para determinar la necesidad de una terapia antioxidante de un sujeto masculino.

40. Uso según la reivindicación 33 o 34 en donde el compuesto espesante es, además un compuesto gelificante.

41. Uso según la reivindicación 35 en donde el compuesto espesante/gelificante es agarosa.

42. Uso según la reivindicación 36 en donde la agarosa es agarosa de bajo punto de fusión.

43. Uso según cualquiera de las la reivindicaciones 33 a 37 en donde el compuesto indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno es una sal de tetrazolio.

44. Uso según la reivindicación 38 en donde la sal de tetrazolio es NBT.

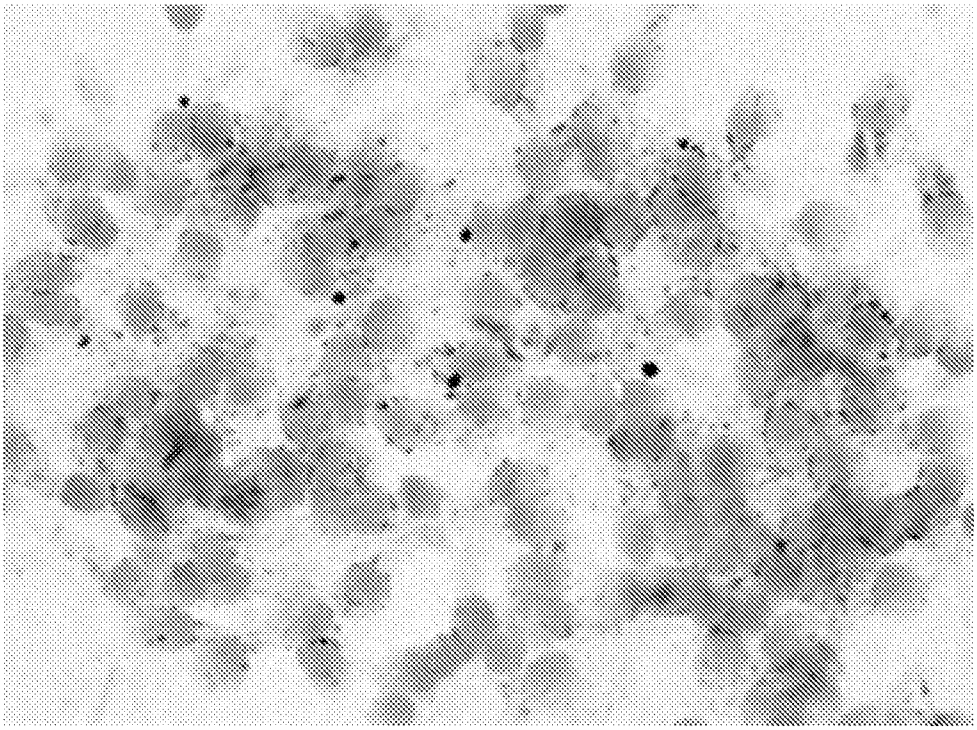


FIGURA 1

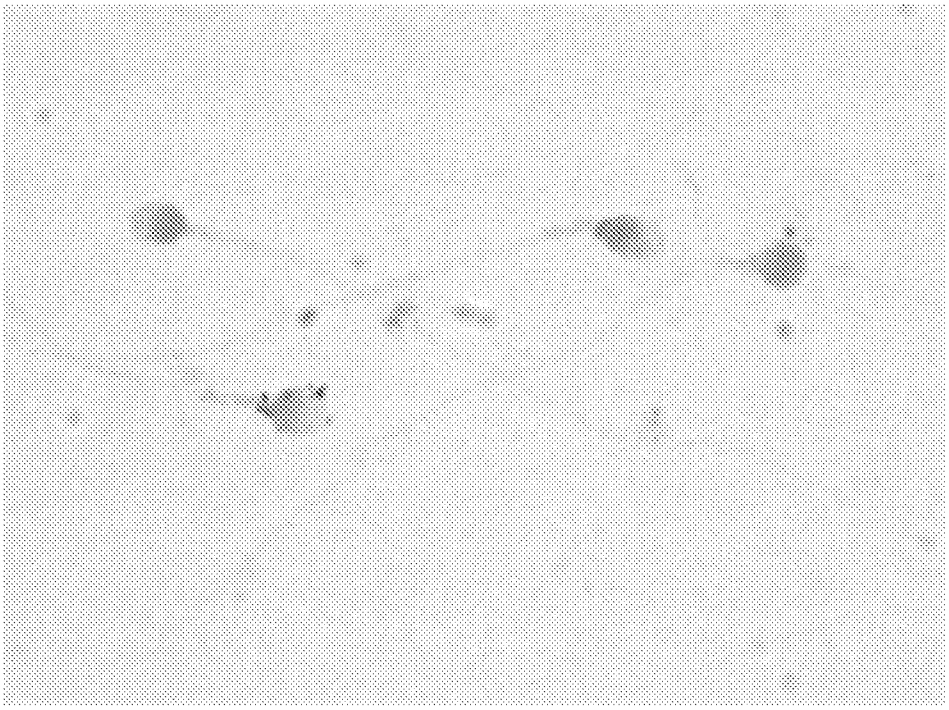


FIGURA 2

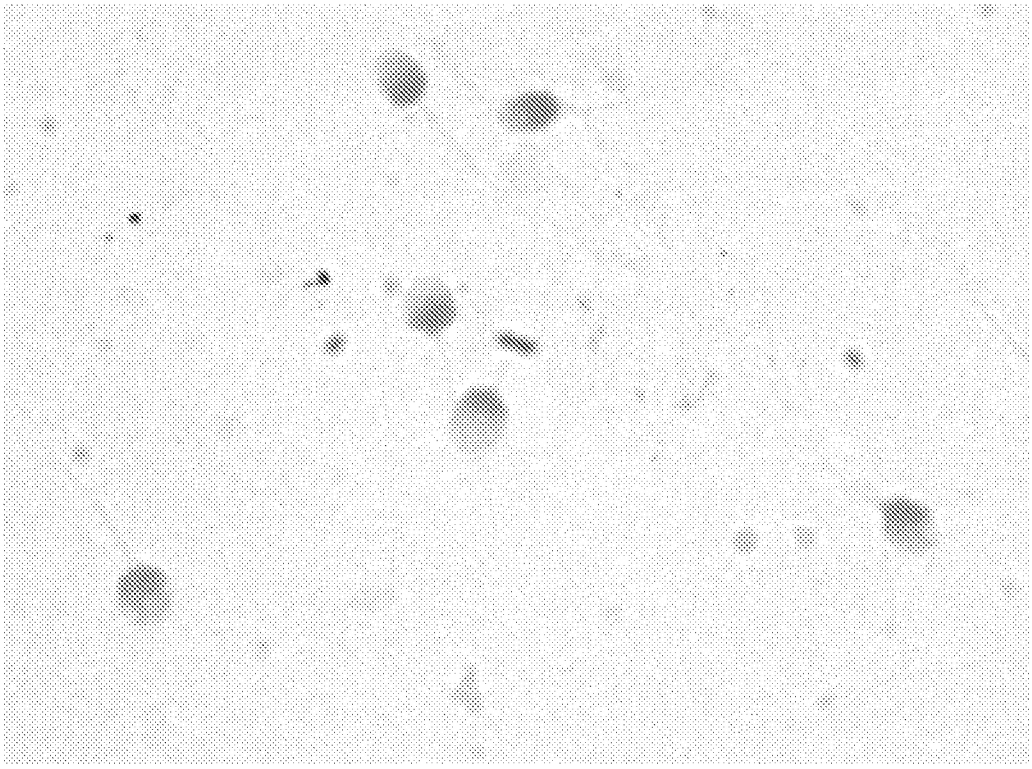


FIGURA 3

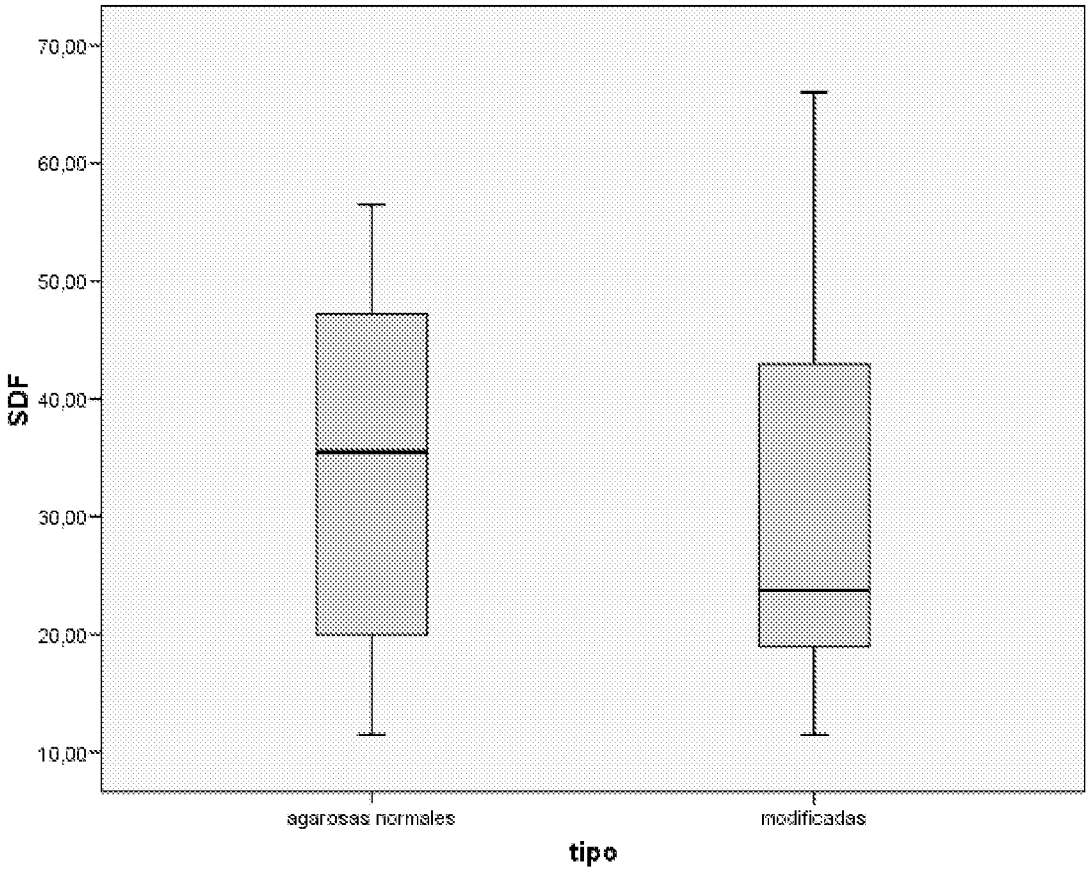

70,00
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
SDF
agarosas normales
modificadas
tipo

FIGURA 4

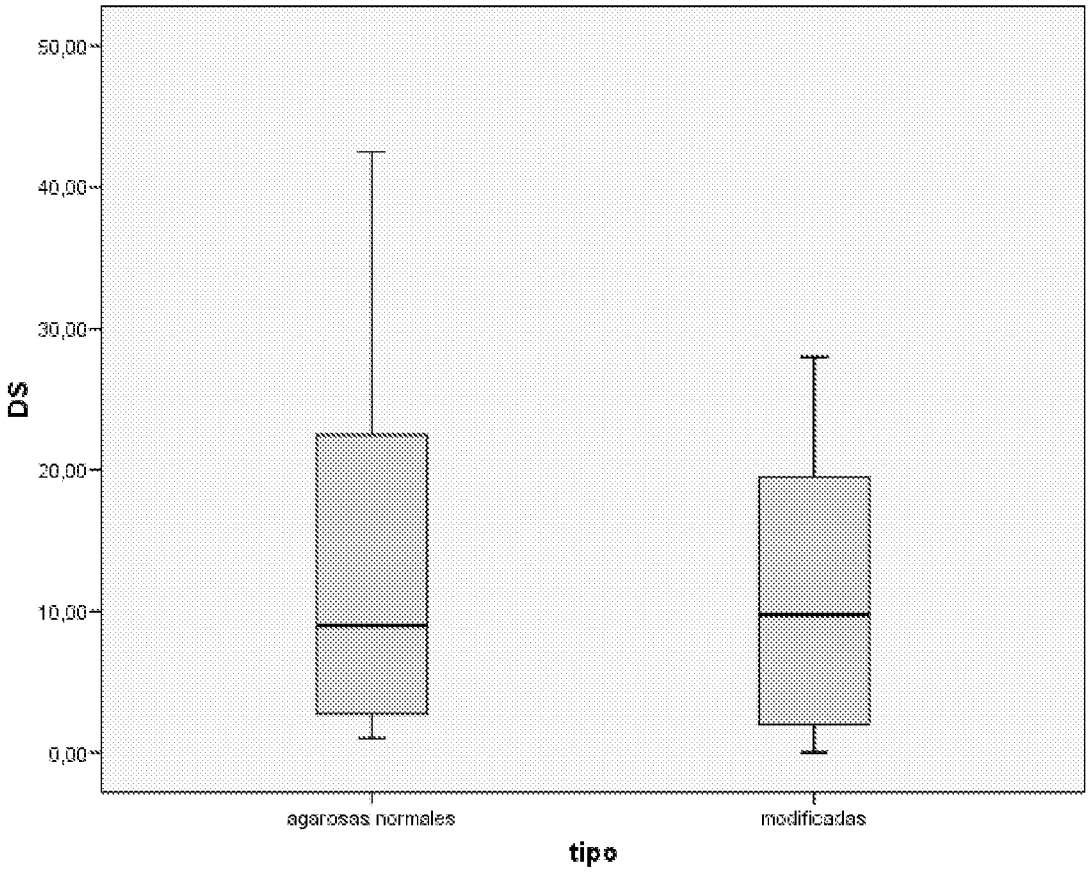

50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
DS
agarosas normales
modificadas
tipo

FIGURA 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070756

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/50 (2006.01)
C12Q1/32 (2006.01)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, EMBASE,MEDLINE,BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TUNC O. ET AOL., "Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress.", International journal of andrology (2010), vol. 33(1), pág.13 - 21. the whole document. Citado by the solicitante.	1-44
A	WO 0132802 A1 (CLEVELAND CLINIC FOUNDATION) 10-05-2001, the whole document.	1-44
A	WO 2009107769 A1 (UNIV TOKYO) 03-09-2009, the whole the document.	1-44
A	ES 2316288 A1 (UNIV NAVARRA PUBLICA) 01-04-2009, the whole document.	1-44
A	WO 2008044138 A1 (UNIV SYDDANSK) 17-04-2008, the whole document.	1-44

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07/02/2012	**(09/03/2012)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer M. Hernandez Cuellar Telephone No. 91 3498409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070756

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008026205 A1 (UNIV BEN GURION) 06.03.2008, the whole document.	1-44
A	GB 2265709 A (BLAKE DAVID RUSSELL) 06-10-1993, the whole document.	1-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ES2011/070756

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO0132802 A	10.05.2001	AU1443001 A	14.05.2001
WO2009107769 A	03.09.2009	US2011111515 A	12.05.2011
ES2316288 AB	01.04.2009	WO2009013384 A	29.01.2009
WO2008044138 A	17.04.2008	NONE	
WO2008026205 A	06.03.2008	NONE	
GB2265709 A	06.10.1993	NONE	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2011/070756

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
G01N33/50 (2006.01)
C12Q1/32 (2006.01)
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
G01N, C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, WPI, EMBASE,MEDLINE,BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	TUNC O. ET AOL., "Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress.", International journal of andrology (2010), vol. 33(1), pág.13 - 21. Todo el documento. Citado por el solicitante.	1-44
A	WO 0132802 A1 (CLEVELAND CLINIC FOUNDATION) 10-05-2001, todo el documento.	1-44
A	WO 2009107769 A1 (UNIV TOKYO) 03-09-2009, todo el documento.	1-44
A	ES 2316288 A1 (UNIV NAVARRA PUBLICA) 01-04-2009, todo el documento.	1-44
A	WO 2008044138 A1 (UNIV SYDDANSK) 17-04-2008, todo el documento.	1-44

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
07/02/2012	**09 de marzo de 2012 (09/03/2012)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado M. Hernandez Cuellar Nº de teléfono 91 3498409

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2011/070756

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2008026205 A1 (UNIV BEN GURION) 06.03.2008, todo el documento.	1-44
A	GB 2265709 A (BLAKE DAVID RUSSELL) 06-10-1993, todo el documento.	1-44

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070756

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO0132802 A	10.05.2001	AU1443001 A	14.05.2001
WO2009107769 A	03.09.2009	US2011111515 A	12.05.2011
ES2316288 AB	01.04.2009	WO2009013384 A	29.01.2009
WO2008044138 A	17.04.2008	NINGUNO	
WO2008026205 A	06.03.2008	NINGUNO	
GB2265709 A	06.10.1993	NINGUNO	