



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 592**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05718163 .8**

96 Fecha de presentación : **26.01.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1710320**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **Procedimiento de determinación de la fragmentación del ADN en espermatozoides de animales.**

30 Prioridad: **26.01.2004 ES 200400163**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2010

73 Titular/es: **Universidad Autónoma de Madrid
Ciudad Universitaria de Cantoblanco
c/ Einstein, nº 3
28049 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Gosalvez Berenguer, Jaime;
Fernández García, José Luis y
Goyanes Villaescusa, Vicente**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 337 592 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de determinación de la fragmentación del ADN en espermatozoides de animales.

5 **Campo de la invención**

Esta invención tiene su campo de aplicación dentro del sector sanitario, principalmente aquel relacionado con la biología de la reproducción, en especial está dirigida a procedimientos y métodos para la determinación de la calidad del semen en animales.

10 **Antecedentes de la invención**

En la actualidad el 6% de los varones de países occidentales, en edad fértil, presentan algún tipo de patología que les impide una reproducción normal. A este efecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha conjuntado en un único protocolo una serie de procedimientos de laboratorio que estandariza en el ámbito internacional el análisis de la calidad del semen. Estos estudios se centran en la determinación de la concentración, morfología (Ankem Murali K *et al.*, "Novel assay for determining DAN organization in human spermatozoa: Implication for male factor infertility" Urology, vol. 59 nº 4, Abril 2002) y motilidad de los espermatozoides, complementada con la evaluación de ciertas pruebas funcionales, así como de determinados parámetros bioquímicos y enzimáticos (USA-5801058) del semen (WHO, 1999). Con este conjunto de pruebas se puede estimar el volumen total del mismo y la concentración de espermatozoides por mililitro y se puede diagnosticar si la infertilidad del varón es debida a una ausencia (azoospermia) o a una disminución clara (oligospermia) de la cantidad de espermatozoides en el eyaculado. Asimismo, se determina la posible existencia de problemas de motilidad (astenozoospermia) que imposibilita que estas células atraviesen la cavidad uterina y alcancen con éxito el tercio externo de las trompas de Falopio. También se analiza si presentan problemas graves de morfología de sus componentes (cabeza, cuello, cola) (teratozoospermia), dado que estas variaciones repercuten en la capacidad para una fertilización eficaz del óvulo femenino. Complementariamente, se explora igualmente la participación de glándulas tales como la próstata y las vesículas seminales (infecciones, agenesias). Por último, pruebas funcionales como la prueba HOS (permeabilidad iónica de membrana celular) o la capacidad de progresión de los espermatozoides *in vitro*, dan una idea de la capacidad fértil del semen. Finalmente, estos estudios de laboratorio precisan, ocasionalmente, completarse con perfiles hormonales, biopsia del testículo y/o la determinación del cariotipo (estudio cromosómico que define la condición heredada del sexo masculino o femenino de un individuo) y/o pruebas de genética molecular.

A pesar de los estudios clínicos y de laboratorio, la causa de la infertilidad no se puede determinar en alrededor del 30%-50% de los varones infértiles, en lo que se denomina infertilidad idiopática. Recientemente, se ha reconocido que el daño del ADN de los espermatozoides podría ser la explicación de un elevado porcentaje de estos casos idiopáticos (Evenson *et al.*, 1999; Larson *et al.*, 2000), de tal modo que el estudio de la fragmentación del ADN de los espermatozoides es un tema de investigación activa con publicaciones continuas en las revistas especializadas (Evenson *et al.*, 2002). Anomalías de la cromatina, e incluso daño en el ADN nuclear de los espermatozoides, podría tener lugar o incluso ser el resultado de anomalías en el empaquetamiento del ADN que tienen lugar durante la espermiogénesis (Sailer *et al.*, 1995). También cabe la posibilidad de que puedan ser el resultado de daño producido por radicales libres que provocan estrés oxidativo (Aitken *et al.*, 1998), o consecuencia de un posible proceso de apoptosis (Gorczyca *et al.*, 1993).

Existen diversos procedimientos para evaluar la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides humanos. Entre ellos se destacan la ruptura de ADN *in situ* introduciendo nucleótidos marcados en el mismo utilizando enzimas tales como transferasa terminal (TUNEL) o ADN polimerasa (*in situ* nick translation ISNT) (Gorczyca *et al.*, 1993). Estos procedimientos se basan en la utilización de enzimas sobre los espermatozoides fijados en portaobjetos. Por esta razón su eficacia no es muy alta, siendo accesibles para la enzima solamente aquellas roturas marcadas, lo cual conduce a una reproducibilidad relativamente baja de los resultados. Los reactivos también son costosos, por lo que estas técnicas sólo se utilizan en investigación, no siendo posible utilizarlas para la evaluación clínica del semen. Otra técnica es el ensayo de cometa (Hughes *et al.*, 1996). Los espermatozoides se incluyen en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y se someten a soluciones de lisis para extraer las membranas y las proteínas. Se obtienen así nucleoides, es decir, núcleos desproteinizados, en los que las fibras de ADN se han desenrollado por estiramiento. Los nucleoides se someten a electroforesis en una cubeta rellena de solución tampón, de tal modo que las fibras de ADN migran hacia el ánodo, creando la imagen de un cometa, con una cabeza y una cola en la dirección de la migración electroforética. Estos cometas se tiñen con un colorante fluorescente, para ser observados mediante microscopía de fluorescencia. Si el núcleo presenta fragmentación del ADN, gran cantidad de fragmentos del mismo habrán migrado, y se habrán concentrado en la cola del cometa. Se trata de una prueba bastante sensible, pero relativamente costosa y complicada para un laboratorio clínico convencional. De hecho, requiere instrumental particularmente poco común: cubeta y transformador eléctrico de electroforesis, microscopía de fluorescencia, y un sistema de captación de las imágenes y de análisis de las mismas. Por todas estas razones no es aplicable al estudio clínico del semen y sólo se utiliza con fines de investigación.

La técnica de referencia actual para el estudio de la fragmentación del ADN de los espermatozoides es el ensayo de estructura de la cromatina de Evenson (SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay; Evenson *et al.*, 1980; 2000; Evenson y Jost, 1994). En esta técnica, los espermatozoides en suspensión se añaden a una solución desnaturalizante ácida. Aquellos espermatozoides sin roturas en su ADN son resistentes a esta desnaturalización ácida, permaneciendo como

ADN de cadena doble. Sin embargo, los espermatozoides con ADN fragmentado sí desnaturalizan su ADN, transformándose en ADN de cadena sencilla. Posteriormente se tiñen con naranja de acridina. Esta tinción emite fluorescencia verde cuando se une al ADN de cadena doble. Sin embargo, en los espermatozoides con ADN desnaturalizado, en cadena simple, este fluorocromo emite fluorescencia roja. Los espermatozoides con ADN desnaturalizado se cuantifican utilizando citometría de flujo, para discriminar entre ambos tipos de fluorescencia. El SCSA es una técnica con gran proyección clínica, que ha sido evaluada en un gran número de pacientes. Utilizando este sistema, se ha establecido que cuando un individuo presenta el 30% o más de los espermatozoides con ADN fragmentado, su probabilidad de conseguir un embarazo que llegue a término es menor del 1%, y esto es aplicable a fecundación natural así como a reproducción asistida (Evenson *et al.*, 1999; Larson *et al.*, 2000).

El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado puede ser más o menos constante en los diferentes ciclos espermatogénicos del individuo, pero también puede variar a consecuencia de factores exógenos, o por ejemplo tras un episodio febril intenso, como una gripe (Evenson *et al.*, 2000). De este modo se pueden hacer estudios seriados, seleccionando aquellas muestras con menor nivel de fragmentación, para ser utilizadas posteriormente en las técnicas de reproducción asistida. Es importante tener en cuenta que la congelación de las muestras de semen en nitrógeno líquido no modifica los niveles de fragmentación del ADN, por lo que se puede realizar esta prueba sobre muestras congeladas, que después se pueden utilizar en inseminación, FIV (fecundación *in vitro*) o ICSI (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides). Esto supone una gran ventaja operativa para el paciente y para el laboratorio.

La técnica SCSA, aunque robusta y altamente reproducible, es un sistema costoso, difícil de implementar, y no muy accesible para el laboratorio básico (De Jonge, 2002). Por estas razones, la calidad del ADN de los espermatozoides todavía no se puede evaluar rutinariamente, a pesar de su contrastado valor clínico en el estudio de la infertilidad.

Recientemente, el grupo de investigación de los autores de la presente describió de modo preliminar una técnica que permitía dispersar *in situ* la cromatina de los espermatozoides humanos, demostrando que aquellos espermatozoides incapaces de dispersar la cromatina contenían ADN fragmentado (Fernández, J.L. *et al. Journal of Andrology*, 2003, vol. 24, no. 1 págs. 59-66: "The sperm Chromatin Dispersion Test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation"). Utilizando este método, se tratan secuencialmente las muestras de semen en microgel de agarosa con una solución ácida desnaturalizante, con dos soluciones de lisis y con un lavado de modo que se pueden secar y teñir después. Esta técnica, que se denomina prueba de Dispersión de la Cromatina del Espermatozoide (SCD: Sperm Chromatin Dispersion), utiliza reactivos y condiciones excesivamente agresivas. El método descrito no da resultados consistentes lo que dificulta la evaluación reiterada. Por otro lado la calidad y contraste de las imágenes obtenidas y la reproducibilidad de los resultados no son lo suficientemente buenas para que se pueda aplicar comercialmente. Además, la estructura de los espermatozoides se ve afectada y la cola no es visible en las muestras. Este problema es importante, ya que no se pueden distinguir con facilidad los espermatozoides de otras células presentes en la muestra, con el consiguiente error en la cuantificación del número de espermatozoides con cromatina/ADN dañados.

Por lo tanto aún subsiste la necesidad de un proceso fiable que pueda ser utilizado de una forma rutinaria y sencilla para el estudio de la calidad del semen de animales y en particular para evaluar la integridad de la cromatina/ADN. El proceso tiene que ser robusto, fácil de implementar, económico y accesible al laboratorio básico. Tiene que resolver los problemas anteriormente mencionados. También tiene que dar resultados homogéneos entre distintos laboratorios y ser susceptible de automatización.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es un procedimiento que es rápido y preciso para evaluar la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides de animales y que se puede incorporar en la actividad rutinaria de cualquier laboratorio de análisis, veterinario o específico de la reproducción humana.

Por lo tanto un objeto de la invención es un procedimiento para evaluar la integridad de la cromatina/ADN y de los espermatozoides de un animal que comprende:

- a) una etapa de tratamiento de la muestra que contiene los espermatozoides, con una solución desnaturalizante del ADN,
- b) una única etapa de tratamiento con una solución de lisis para extraer proteínas nucleares,
- c) una etapa para evaluar la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides, caracterizada porque la solución de lisis no contiene detergente desnaturalizante de proteínas y esencialmente no se destruye la cola de los espermatozoides.

En general se prefiere que la etapa a) preceda a la b).

Como se indica, la selección de la solución de lisis es crítica para alcanzar los objetivos de la invención. Entre los detergentes desnaturalizantes de proteínas que no se deben utilizar están los detergentes aniónicos y catiónicos como por ejemplo SDS, dodecilsulfato, sulfonato de alquilbenceno de sodio, sal hidratada del ácido glicocólico, etc. Son detergentes que provocan una gran disrupción de membranas, con efecto de lisis y al mismo tiempo son activos en la desnaturalización de proteínas. Se utilizan en electroforesis desnaturalizante en las que se somete a las proteínas

a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). Son especialmente activos a pH ácido, preferentemente sobre bacterias Gram-positivas. Su actividad dentro de los detergentes es alta.

En el procedimiento de la invención preferentemente se utiliza un detergente no iónico no desnaturalizante de proteínas, es decir un detergente que solubiliza las proteínas pero no las desnaturaliza. Entre ellos se prefiere el toctilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100), N,N-Bis(3-D-gluconamidopropil) colamida (bigCHAP), Brij(r) 35 P, N-decanoil-N-metilglucamina, digitonin, dodecanoil-N-metilglucamida, heptanoil-N-metilglucamida, octilfenoxi poly(etilenoxi) etanol ramificado (Igepal CA-630), N-Nonanoil-N-metilglucamina, Nonidet P 40, N-Octanoil-N-metilglucamine, solución Span 20, polisorbato 20 (Tween 20). Particularmente preferido es el Triton X-100 por los buenos resultados que da y su fácil disponibilidad.

Se prefiere que la solución de lisis tenga una fuerza iónica suficiente para facilitar el proceso de lisis sin desnaturalización. Los autores de la invención han comprobado que una solución eficaz es la que contiene cloruro sódico entre 1 M y 3 M, ditioneitol (DTT) entre 0,001 M y 2 M, 2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) entre 0,001 M y 2 M y Triton X-100 entre 0,1% y 3%. Particularmente apropiada es una solución que contiene NaCl alrededor de 2,5M, DTT alrededor de 0,2M, Tris alrededor de 0,2M, Triton X-100 alrededor de 1% y pH alrededor de 7,5.

La solución desnaturalizante del ADN es preferentemente ácida, por ejemplo de un ácido seleccionado del grupo ácido clorhídrico, acético, nítrico o mezclas de éstos. De forma preferente es una solución de ácido clorhídrico.

El procedimiento de acuerdo a la invención tiene una etapa de evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides después de las etapas a) y b). Aunque hay varias alternativas para esta evaluación, se prefiere que sea visual. Con este fin el procedimiento incluye preferiblemente una etapa de tinción de la muestra después de las etapas a) y b). Una tinción que da excelentes resultados y permite visualizar tanto la cola de los espermatozoides como el halo característico formado es una solución similar a la de Wright.

En una variante preferida los espermatozoides se incluyen en un medio similar a una suspensión, preferentemente en un microgel, especialmente en un microgel de agarosa.

La invención también se dirige a un Kit para evaluar la calidad de los espermatozoides de animales que comprende:

- a) una solución desnaturalizante del ADN,
- b) una solución de lisis para extraer proteínas nucleares,

caracterizado porque la solución de lisis no contiene detergente desnaturalizante de proteínas y esencialmente no destruye la cola de los espermatozoides. El Kit permite llevar a cabo el procedimiento según la invención que se acaba de describir.

40 Descripción de las figuras

Figura 1. Parámetros utilizados para la definición del tamaño de los halos en espermatozoides humanos, según la metodología de la invención. 1a: El nucleóide, que corresponde al núcleo masivamente desproteínizado del espermatozoide, se compone de dos partes: silueta del núcleo del espermatozoide, denominada el centro, en posición central, y un halo periférico de dispersión de la cromatina/ADN. La cola del espermatozoide es visible. 1b: Filtro de relieve para una mejor visualización y establecimiento de los límites entre el halo y el centro. 1c: Diámetro menor del centro (a) y grosor del halo (b), como muestra de las medidas utilizadas para establecer los distintos tamaños de los halos, tal y como se explica en la metodología de la invención.

Figura 2. Diferentes tipos de espermatozoides definidos según el tamaño del halo que se genera tras aplicar la metodología de la invención. 2a: Espermatozoide con halo de tamaño grande. 2b: Espermatozoide con halo de tamaño mediano. 2c: Espermatozoide con halo de tamaño pequeño. 2d: Espermatozoide sin halo. 2e: Espermatozoide sin halo y degradado. 2f: Campo general en el que se observan los distintos tipos de espermatozoides anteriormente descritos.

Figura 3. Correlación entre los distintos tamaños de halo visualizados tras la tinción con DAPI (a-e, azul de fluoresceína) y la señal de hibridación *in situ* utilizando una sonda de ADN humano genómico total, según la metodología de DBD-FISH (a'-e', rojo de fluoresceína) para visualizar el nivel de fragmentación del ADN. 3 a: Espermatozoide con halo y baja señal de hibridación (3 a'). 3b: Espermatozoide con halo mediano y baja señal de hibridación, aunque ligeramente mayor que en el caso anterior (3 b'). 3 c: Espermatozoide con halo pequeño y notable aumento en el nivel de hibridación (3 c'). 3 d: Espermatozoide sin halo y alto nivel de hibridación (3 d'). 3 e: Espermatozoide degradado y mostrando una distribución irregular de la hibridación (3 e').

Figura 4. Aplicación del procedimiento de la invención a muestras de espermatozoides de las siguientes especies: ratón (*Mus musculus*), toro (*Bos taurus*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y lombriz de tierra (*Lombricus terrestris*). 4a corresponde a toro; 4b,c,d corresponde a ratón; 4 e corresponde a la lombriz de tierra; 4 f corresponde al rodaballo.

Figura 5. Muestra de paciente con presencia de altos niveles de leucocitospermia. Se aprecia la ausencia de cola en los leucocitos, que permite diferenciarlos del resto de los tipos celulares.

Descripción detallada de la invención

Como se detallará, el procedimiento y Kit de la invención son un sistema sencillo y fiable para la determinación de la frecuencia de espermatozoides con ADN fragmentado. La metodología es aplicable en los laboratorios de andrología y clínicas de reproducción asistida y laboratorios de reproducción animal. También es un sistema muy versátil ya que es posible congelar las muestras y analizarlas cuando se necesite, sin inducir cambios en los resultados del análisis.

El procedimiento de la invención, que permite la evaluación de la integridad de la cromatina/ADN y de los espermatozoides de un animal comprende:

- a) una etapa de tratamiento de la muestra que contiene los espermatozoides, con una solución desnaturalizante del ADN;
- b) una única etapa de tratamiento con una solución de lisis para extraer proteínas nucleares, que no contiene detergente desnaturalizante de proteínas y esencialmente no destruye la cola de los espermatozoides;
- c) una etapa de evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides.

Además de otras, las principales diferencias del procedimiento de la invención, con respecto al estado de la técnica y concretamente respecto a Fernández, J.L. *et al. Journal of Andrology*, 2003, vol. 24, no. 1 págs. 59-66, residen básicamente en el ámbito de la lisis y de la tinción. Así, se utiliza una única solución de lisis, en vez de dos secuenciales. La composición es distinta puesto que no contiene ni SDS (detergente aniónico desnaturalizante de proteínas) ni EDTA (agente quelante). Puede incorporar un detergente neutro relativamente suave, no desnaturalizante, tal como Triton X-100.

Técnicamente estas diferencias conducen a la conservación de las colas de los espermatozoides. Es una mejora crucial, pues su detección es un dato indispensable para poder discriminar si las imágenes de nucleoides provienen realmente de espermatozoides o corresponden a otros tipos celulares que pudieran estar presentes, por ejemplo, células descamadas del tracto genitourinario, células inflamatorias, sangre, etc. Esta persistencia se consigue utilizando una lisis mucho menos agresiva, así como prescindiendo del uso del SDS.

Además, la lisis más suave consigue el despliegue de las fibras de cromatina, que conserva mejor la morfología de la cabeza, o centro, y que obtiene halos de dispersión con mayor densidad de material cromatínico, dando como resultado que se tiñen más intensamente. En consecuencia, se mejoran muchísimo el contraste y la discriminación visual de los distintos tamaños de halo, especialmente cuando se utiliza la tinción de Wright.

Otra ventaja significativa es que la ausencia de detergente desnaturalizante de proteínas, como el SDS, permite el uso secuencial de la técnica aquí descrita con otras que permiten visualizar otros componentes celulares. Así, sobre los nucleoides obtenidos, según la metodología descrita, se pueden aplicar métodos para la inmunodetección de proteínas, tipos de proteínas de lamininas y otras proteínas nucleares, así como detección de ARN asociado a la matriz nuclear, pues el ADN se extiende manteniéndose la mayor cantidad de estructura nuclear posible. Esto es importante en ciertos temas de investigación de la estructura nuclear del espermatozoide.

Otra ventaja adicional es la utilización de una menor cantidad de reactivos y, por consiguiente, hay menos coste económico. Por ejemplo, DTT es especialmente costoso, y la reducción de la concentración descrita en los ejemplos (un cuarto de la descrita en el artículo) es significativa para el coste.

De lo expuesto se desprende que el procedimiento a patentar da como resultado imágenes de nucleoides de espermatozoides muy mejoradas y más reproducibles respecto al estado de la técnica. Es posible discriminar si los nucleoides provienen o no de espermatozoides maduros o de otros tipos celulares, y la categorización del tamaño del halo es mucho más precisa y fiable. En consecuencia, con el procedimiento a patentar, la determinación de los niveles de fragmentación del ADN de la muestra es mucho más fiable, lo que significa que se puede utilizar de forma rutinaria y sencillamente y a un bajo coste. Su aplicación es pertinente en distintos laboratorios, tanto de ámbito clínico y sobre muestras humanas, como en laboratorios veterinarios para el estudio de muestras animales. Esto es muy importante, pues es una prueba con posible aplicación clínica a pacientes.

La secuencia de las etapas de tratamiento de la muestra se puede hacer en cualquier orden, primero con una solución desnaturalizante del ADN, seguida por la etapa de tratamiento con una solución de lisis o viceversa. Pero se prefiere tratar antes la muestra con la solución desnaturalizante del ADN y después con la solución de lisis ya que da mejores resultados. En la otra variante (lisis seguida de desnaturalización del ADN) los espermatozoides con ADN fragmentado se comportan de distinta manera. En este caso, dispersan fragmentos de cromatina/ADN, dando lugar a halos de mayor tamaño. Incluso un único tratamiento con una solución de lisis puede ser suficiente para observar este comportamiento, aunque la discriminación de los tamaños de halo no es muy precisa.

A continuación se detalla el procedimiento de la invención, junto con algunas variantes y etapas opcionales. El experto en la materia entenderá que hay otros modos de realización y posibilidades siempre que se mantengan los aspectos fundamentales que se describen.

ES 2 337 592 T3

La primera etapa es la preparación de la muestra. Ésta se obtiene utilizando procedimientos comunes en este campo se obtiene y se determina la concentración de espermatozoides en la muestra. La concentración adecuada para este análisis oscila entre 0.1 y 20 millones de células por mililitro. Si la muestra está muy concentrada se ajusta a una concentración adecuada diluyéndola con medio de cultivo o con solución de fosfato tamponado/suero salino (PBS) o similar.

La muestra de semen se debe poner sobre un soporte para su procesado según el procedimiento de la invención y para facilitar su evaluación. El soporte preferentemente es un portabjetos de cristal que se puede recubrir con una película de agarosa estándar. Para ello, se prepara una solución de agarosa estándar entre 0.2% y 1% en agua destilada en una jarra de Coplin o similar. Se cubre con una lámina de plástico agujereada y se coloca en un horno de microondas. Se regula el horno de microondas a una potencia entre 300-1000 W, por ejemplo 500 W, agitando el recipiente para una mejorar la disolución de la agarosa, dejándola hasta que hierva. Este procedimiento también se puede realizar utilizando un baño termostático. Cuando la solución de agarosa se vuelva totalmente transparente, ya estará preparada para depositarla en recipientes verticales entre 10 ml y 250 ml. Estos recipientes deberán estar previamente atemperados en un baño entre 60°C-100°C, por ejemplo 70°C, para mantener la solución de agarosa en estado líquido.

Antes de introducir los portaobjetos en la solución de agarosa, estos se limpian frotando con un paño para eliminar posibles impurezas. Los portaobjetos se sumergen verticalmente, sujetándolos con unas pinzas por la zona esmerilada, entre 1-60 segundos, retirándolos y volviéndolos a sumergir entre 1 y 10 veces, hasta formar una película homogénea sobre el portaobjetos. Estos se depositan horizontalmente sobre una superficie lisa, por ejemplo de vidrio o de metal y se enfrían entre 1°C y 15°C, preferentemente a 4°C. Esta placa, con los portaobjetos, se coloca en el refrigerador a 4°C durante 30 min, hasta que se comprueba que la agarosa ha gelificado sobre la superficie de los portaobjetos. Se retiran las bandejas del refrigerador y se limpia la superficie de los portaobjetos que estaba en contacto con la placa con un papel secante. Seguidamente, los portaobjetos se colocan horizontalmente en una estufa de secado en un intervalo de temperatura de 37-100°C, hasta que la agarosa se seca por completo y forma una película fina adherida al vidrio. Los portaobjetos así tratados se pueden utilizar inmediatamente o se pueden almacenar en una caja bien cerrada a temperatura ambiente durante varios meses.

Para facilitar el procesamiento de la muestra que contiene los espermatozoides, ésta se puede incluir en un medio con características similares a las de una suspensión tal como por ejemplo un microgel de agarosa. En este caso, se prepara una solución de agarosa de bajo punto de fusión/baja gelificación a una concentración entre el 0.5% y el 2% en agua destilada. La gelificación este agar se realiza en un horno de microondas o un baño termostático, y se mantiene posteriormente entre 30°C y 37°C en un tubo colocado en un baño termostático o estufa de secado. En un tubo Eppendorf o similar, se mezclan cuidadosamente el semen y la solución de agarosa, de manera que esta última quede a una concentración entre 0.3% y 1%. Por ejemplo, 70 microlitros de solución de agarosa + 30 microlitros de la muestra. Es importante que la solución de agarosa no esté a temperatura superior a 37°C, para no dañar a las células.

Finalmente, para obtener la muestra sobre el soporte, se colocan los portaobjetos recubiertos sobre una superficie lisa y fría de vidrio o de metal, con una temperatura que oscile entre 1°C y 15°C, evitando formar burbujas de aire. Se recomienda depositar con una micropipeta una gota entre 5-200 microlitros de la mezcla, colocando un cubreobjetos encima de la gota. Como precaución, se recomienda procesar cada muestra por duplicado, y utilizar una muestra control cada vez que se aplique la técnica. La placa con los portaobjetos, se coloca en un refrigerador a 4°C, entre 2 y 30 minutos hasta que se produzca gelificación adecuada de la agarosa. Una vez que ha ocurrido la gelificación, entonces se retiran los cubreobjetos con mucha suavidad, desde el mismo refrigerador asegurándose de que no se daña el microgel.

Una vez que se preparan adecuadamente las muestras para su fácil y repetido manejo, se tratan a continuación de acuerdo al procedimiento de la invención con una etapa de tratamiento con solución desnaturalizante del ADN y una etapa de lisis para extraer las proteínas nucleares.

En una variante preferida se colocan primero los portaobjetos con la muestra en posición horizontal en un recipiente que contiene la solución desnaturalizante. La solución desnaturalizante del ADN puede ser ácida, por ejemplo una solución de ácido acético, ácido nítrico, ácido sulfúrico, o alcalina como por ejemplo una solución de hidróxido sódico, hidróxido bórico, hidróxido potásico, a concentraciones débiles. En una variante preferida se utiliza una solución de ácido clorhídrico a una concentración que oscila entre 0.01 N y 0.5 N, preferentemente entre 0.1 N y 0.3 N, particularmente preferida es una concentración alrededor de 0.2 N. Se recomienda que esta solución se prepare el mismo día que se realiza la prueba y que se mantengan los portaobjetos en incubación en la solución desnaturalizante del ADN entre 1 y 15 minutos a una temperatura entre 1°C y 37°C, preferentemente 18°C-25°C, preferentemente 20-22°C.

Una vez finalizada esta parte del proceso, se procede a efectuar la lisis de la muestra con una única solución de lisis que es suficientemente suave para que no destruya las colas de los espermatozoides. Para ello, cada portaobjetos se sumerge, en posición horizontal, en otro recipiente que lo contiene.

Como se mencionó antes, la solución de lisis es seleccionada de tal manera que consiga el despliegue de las fibras de cromatina conservando mejor la morfología de la sección de cabeza y por lo tanto la formación de los halos característicos con mayor densidad de material cromatínico. También tiene que ser lo suficientemente suave para la conservación de las colas de los espermatozoides. Esto se consigue garantizando que se evitan los detergentes

ES 2 337 592 T3

agresivos y desnaturalizantes de proteínas. Adicionalmente, el control de la concentración iónica también posibilita que se module este efecto.

5 En una variante preferida esta solución esté compuesta por: cloruro sódico entre 1 M y 3 M, preferentemente entre 2 M y 3 M; ditiotreitól (DTT) entre 0,001 M y 2 M, preferentemente entre 0,01 M y 0,8 M; 2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) entre 0,001 M y 2 M, preferentemente entre 0,01 M y 0,4 M; y Triton X-100 entre 0,1% y 3%, preferentemente entre 0,5%-1,5%. Esta solución se ajusta a pH entre 6,5 y 8,5, preferentemente 7-7,5.

10 Existen otras soluciones de lisis alternativas, o bien se pueden variar las concentraciones y tiempos y temperaturas de incubación de la solución siempre que se mantengan sus características funcionales. Asimismo, como alternativas al DTT, existen compuestos como beta-mercaptoetanol y otros agentes reductores. Como alternativas al Tris, se pueden utilizar otras soluciones tampón, tales como Hepes, Mops, Pipes. Como alternativa al Triton X-100, se pueden utilizar otros detergentes neutros como se ha mencionado más arriba.

15 Según la solución utilizada y el tipo de muestra, las preparaciones se incuban en la solución de lisis entre 1 y 60 minutos, preferentemente entre 15 y 35 minutos, particularmente preferido es un tiempo alrededor de 25 minutos; y a una temperatura entre 1°C y 37°C, preferentemente entre 18°C-25°C, y particularmente preferida es una temperatura de 20°C-22°C.

20 Como alternativa global a los procesos previamente descritos, se puede invertir el orden de incubación en las soluciones desnaturalizantes y de lisis. Los efectos sobre la cromatina de los espermatozoides también permiten discriminar los espermatozoides con cromatina/ADN dañado del resto de los espermatozoides. Los detalles de las diferencias obtenidas se describirán en el ejemplo número 6.

25 Después del tratamiento con solución desnaturalizante del ADN y con la solución de lisis, las preparaciones se pueden lavar para eliminar los restos de estas soluciones. Para ello se utiliza una solución de lavado lo más suave posible, evitando agente quelantes o detergentes. Por ejemplo, se sumergen en posición horizontal en un recipiente que contiene abundante agua destilada o una solución tampón o suero fisiológico durante un tiempo entre 1 y 60 minutos.

30 A continuación se deshidrata la muestra. Para ello se pueden utilizar concentraciones crecientes de alcohol. Por ejemplo, se levantan los portaobjetos y se sumergen en posición horizontal, en recipientes con series de concentraciones crecientes de etanol, entre 5% y 100%, durante 30 segundos a 60 minutos cada una y después las preparaciones se dejan secar al aire. Como alternativas a las incubaciones en series de etanol, las preparaciones se pueden deshidratar incubando en soluciones de distintos alcoholes tales como metanol, o bien se dejan secar al aire o en estufa de secado.

35 Una vez secos, los portaobjetos ya procesados conteniendo la muestra de semen se pueden guardar en cajas de almacenamiento a temperatura ambiente durante meses. Esto ayuda a separar el proceso de tratamiento según la invención de la posterior etapa de evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides. El almacenamiento posibilita evaluaciones repetidas a distintos intervalos de tiempo varias muestras del mismo individuo.

40 Una vez tratadas las muestras según la invención, se pasan a la etapa de evaluación. Hay varios procesos posibles para evaluar la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides como se ha indicado más antes. La ventaja es que las muestras tratadas según la invención presentan un halo mucho más claro de visualizar y la estructura de los espermatozoides se ha mantenido, particularmente la integridad de las colas, lo cual posibilita que se distingan claramente los espermatozoides de otros tipos de células.

45 En una variante preferida se aplica una tinción a la muestra que facilita la evaluación visual. Eligiendo condiciones de tinción adecuadas se pueden obtener imágenes de alta calidad y una alta consistencia en los resultados de la evaluación. Existen varias estrategias para la tinción, según se utilice microscopio convencional, de campo claro, o microscopio de fluorescencia.

Tinción para observación con microscopio de campo claro

55 En este caso las tinciones que se pueden utilizar son de los tipos Wright, Giemsa, Orceína, reactivo de Schiff, Carmín acético, tiazinas y mezclas del tipo Romanowsky o bien derivados de los anteriormente citados (ver Chromosome banding de AT Sumner, págs. 90-91).

60 Se prefieren tinciones como la de Wright por la tinción más intensa de la muestra y en particular de los halos. Con estas tinciones se mejoran significativamente el contraste y la discriminación visual de los halos de distintos tamaños. También presentan la ventaja del bajo coste y fácil disponibilidad para todo tipo de laboratorio. Su utilización posibilita que se visualicen las colas, pues éstas no son visibles normalmente en tinciones del ADN con los fluorocromos utilizados para microscopios de fluorescencia. Es importante destacar que esta tinción se maneja muy fácilmente para conseguir el nivel de tinción apropiado, una acción que no es posible con Diff-Quik o similares.

65 Otras tinciones, como Diff-Quik, descrita por Fernández, J.L. *et al. Journal of Andrology*, 2003, vol. 24, no. 1 págs. 59-66, son considerablemente más débiles y no consiguen un contraste adecuado del halo con respecto al fondo. En consecuencia, cuando el halo se dispersa mucho, suele ser difícil visualizar su silueta periférica, siendo confundido a

ES 2 337 592 T3

veces como un halo pequeño, asignando así la categoría de fragmentado a un espermatozoide que tiene ADN intacto. Es decir, el procedimiento de la publicación tiene tendencia a sobreestimar los niveles de fragmentación, particularmente en la tinción de campo claro. Esto es relativamente comprometido para una prueba con posible aplicación a individuos. Por lo tanto, es obvio que esta mejora tiene enorme relevancia en la fiabilidad de la técnica.

En una variante de la tinción de la muestra se mezcla solución de Wright (Merck 1.01383.0500) con solución tampón de fosfato por ejemplo a pH 6,88 (Merck 1.07924.1000) en una proporción entre 1:30 y 30:1 (v/v). Se deposita una capa de tinción, en horizontal, que cubra el microgel seco. El tiempo de tinción para conseguir un contraste óptimo, oscila entre 30 segundos y 60 minutos. Se recomienda soplar sobre la capa de tinción ocasionalmente. Se decanta el exceso de tinción, se lavan los portaobjetos suavemente con agua corriente y se dejan secar. Si la tinción es excesiva, se puede lavar, con la misma intensidad, en agua. Otra posibilidad es desteñir en etanol, secar y volver a teñir. Si la tinción es débil, particularmente en la región de los halos de dispersión de la cromatina, se puede teñir otra vez directamente con solución de Wright.

Como alternativas, se pueden utilizar otras tinciones tales como Hemacolor 2 (Merck 1.11956) y Hemacolor 3 (Merck 1.11957), Giemsa, así como otras soluciones de tinción de la misma familia.

Tinción para observación con microscopio de fluorescencia

Dependiendo de la disponibilidad de filtros de fluorescencia, las muestras se pueden teñir con fluorocromos específicos para ADN del tipo DAPI, Hoechst 33258, Bromuro de Etidio, Yoduro de Propidio, etc., en un medio antidesvanecimiento (por ejemplo Vector H-1000).

Si se desean preparaciones permanentes, los portaobjetos procesados y teñidos se pueden incluir en medios de montaje (por ejemplo, Entellan; Merck 1.07961).

Finalmente, se evalúa la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides procediendo a distinguir los tipos celulares. Como ya se ha mencionado, el procedimiento de la invención hace mucho más fácil esta evaluación respecto al estado de la técnica.

Las imágenes obtenidas se pueden estudiar mediante análisis visual directo o bien aplicando software de análisis de imágenes digitalizadas, obtenidas utilizando cámaras analógicas o digitales, acopladas a las plataformas del microscopio.

Inicialmente, se recomienda el estudio de un mínimo de 500 espermatozoides por muestra, adoptando los siguientes criterios básicos (véanse Figura 1 y Figura 2):

1. Espermatozoides sin halo de dispersión de la cromatina (Figura 1).
2. Espermatozoides sin halo de dispersión de la cromatina y degradados: aquellos que sin mostrar halo, presentan la cabeza fragmentada en gránulos o muestran una tinción muy débil. (Figura 1).
3. Espermatozoides con halo de dispersión de tamaño pequeño: el grosor del halo es igual o menor que $1/3$ del diámetro menor del centro (Figura 1).
4. Espermatozoides con halo de dispersión de tamaño mediano: el grosor del halo está entre: más de $1/3$ del diámetro menor del centro y menor que el diámetro del "core" (Figura 1).
5. Espermatozoides con halo de dispersión de tamaño grande: espermatozoides cuyo halo es igual o mayor que el diámetro menor del centro (Figura 1).
6. Otros: núcleos de células que no corresponden a espermatozoides. Una de las características morfológicas que los distinguen es la ausencia de cola.

Se pueden considerar espermatozoides con ADN fragmentado aquellos sin halo de dispersión de la cromatina 1, los que se presentan sin halo de dispersión de la cromatina y degradados 2 y aquellos con halo de dispersión de tamaño pequeño 3. Aquellos espermatozoides con halo de dispersión de la cromatina de tamaño grande y mediano y la fragmentación de ADN derivan de los resultados obtenidos utilizando la técnica de DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence *In Situ* Hybridization; Fernández *et al.*, 1998; 2000; 2002; Fernández y Gosálvez, 2002). Este procedimiento permite la detección y cuantificación de las roturas del ADN en núcleos de células, desproteinizados y sometidos a una desnaturalización controlada del ADN. Esta desnaturalización genera tramos de ADN de cadena sencilla a partir de los extremos de rotura, los cuales son detectados mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda de ADN genómico total marcada con un fluorocromo, visible mediante microscopio de fluorescencia. Cuando el nivel de roturas en el ADN celular es mayor, la cantidad de sonda hibridada es mayor y la fluorescencia observada es mayor. Las muestras procesadas según el procedimiento descrito en la presente invención, contienen ADN de cadena sencilla, creado por la solución desnaturalizante, a partir de los posibles extremos de rotura que existen en el ADN. Por lo tanto, la intensidad de la hibridación utilizando la sonda de ADN genómico total, estará en relación con la cantidad de roturas presentes en el núcleo del espermatozoide. De este modo se ha confirmado que los nucleoides sin halo, o con un halo

ES 2 337 592 T3

de tamaño muy reducido, muestran un marcaje intenso con DBD-FISH, lo cual demuestra la intensa fragmentación de su ADN (Figura 2). El resto de nucleoides muestran unos niveles muy bajos de marcador con esta sonda, que se corresponden con la profundidad de hibridación por el propio tratamiento de la cromatina.

5 La invención también contempla un Kit para la evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de espermatozoides animales. Este Kit contiene una solución desnaturalizante del ADN y una solución de lisis para extraer las proteínas nucleares, que se caracteriza porque la solución de lisis no contiene detergente desnaturalizante de proteínas y esencialmente no destruye la cola de los espermatozoides. Las soluciones desnaturalizantes de ADN preferidas y las soluciones de lisis preferidas están descritas más arriba.

10 Opcionalmente, el Kit puede contener también el soporte pretratado, por ejemplo con agarosa, así como una solución para la preparación de un medio con características similares a las de una suspensión que contendría la muestra. Por ejemplo, una solución de agarosa de bajo punto de gelificación que permite que se prepare un microgel.

15 A continuación se detalla el contenido y las instrucciones de uso de un Kit según una variante de la invención:

Descripción del contenido del kit

20 Portaobjetos pretratados*
Tubos Eppendorf que contienen agarosa de bajo punto de gelificación tubo (A)
Tubo con HCl 37%, tubo (B)
25 Tubos con solución de lisis, tubo (C)*. Composición: NaCl 2,5M, DTT 0,2M, Tris 0,2M, Triton X-100 1%, pH 7,5
Recipientes de procesado para la solución desnaturalizante y para solución de lisis
Lanceta
30 Flotadores para los tubos Eppendorf
* Preparación tal y como se mencionó antes en la descripción

35 *Material e instrumental requerido*

Microscopio de campo claro o fluorescencia (se recomienda objetivo de inmersión)
40 Refrigerador a 4°C
Baño de incubación a 37°C
Guantes de plástico
45 Cubreobjetos de vidrio (18x18 mm, 22x22 mm o 24x60 mm)
Micropipetas
50 4 recipientes para incubación horizontal
Agua destilada
Etanol 70%, 90%, 100%

55 *Instrucciones de uso*

Preparación de una muestra por portaobjetos

60 1) Tomar un matraz C para colocar la solución de lisis a temperatura ambiente (22°C)
2) Diluir la muestra de semen en medio de cultivo o PBS, a una concentración de 5-10 millones por mililitro. Se pueden utilizar tanto muestras recientes como congeladas directamente en nitrógeno líquido.

65

ES 2 337 592 T3

Preparación del microgel de agarosa

- 3) Golpear ligeramente un tubo Eppendorf con agarosa de bajo punto de gelificación (Tubo A), en posición vertical, para depositar la agarosa en el fondo del tubo.
5
- 4) Añadir 140 microlitros de agua destilada, evitando la formación de burbujas, y resuspender.
- 5) Introducir el tubo A en el flotador, dejándolo al nivel de la tapa, y dejarlo flotar 5 minutos en agua a 90-100°C, hasta que la agarosa se disuelva. La fusión de la agarosa se puede realizar como alternativa en un horno de microondas.
10
- 6) Transferir el tubo A con el flotador, a un baño termostático a 37°C, y dejar 5 minutos hasta que alcance la temperatura.
- 7) Añadir 60 microlitros de la muestra de semen al contenido del tubo A y resuspender.
15
- 8) Colocar un portaobjetos pretratado sobre una superficie fría, a 4°C (por ejemplo, una lámina de metal o de vidrio).
- 9) Una vez se han enfriado los portaobjetos, depositar la suspensión celular del tubo A y colocar un cubreobjetos de vidrio, evitando formar burbujas de aire. Se recomienda depositar una gota de 11, 17 y 50 microlitros, para un cubreobjetos de 18x18 mm, 22x22 mm, ó 24x60 mm, respectivamente.
20
- 10) Colocar la lámina fría con los portaobjetos en el refrigerador y dejar que gelifique la muestra durante 5 minutos.
25

Procesado de las muestras

- 11) Preparar la solución desnaturalizante. Para ello, añadir 80 microlitros del contenido del tubo B en 10 mililitros de agua destilada, mezclar y colocar en la caja verde.
30
- 12) Retirar los cubreobjetos, deslizándolos con suavidad, e inmediatamente colocar el portaobjetos, horizontalmente, en la solución desnaturalizante y dejar que se incuben durante 7 minutos, a temperatura ambiente (22°C).
35
- 13) Levantar los portaobjetos con ayuda de la lanceta, usando guantes. Sujetarlos horizontalmente, y colocarlos horizontalmente, en el recipiente blanco que contiene 10 ml de solución de lisis (tubo C atemperado). Incubar durante 25 minutos.
40
- 14) Levantar los portaobjetos y colocarlos horizontalmente en un recipiente que tiene abundante agua destilada para lavar la solución de lisis. Dejar durante 5 minutos.
- 15) Colocar los portaobjetos, horizontalmente, en un recipiente con etanol al 70% (2 minutos), luego en etanol al 90% (2 minutos), y finalmente en etanol al 100% (2 minutos).
45
- 16) Dejar secar al aire. Una vez secos los portaobjetos procesados se pueden almacenar en cabinas archivadoras, a temperatura ambiente durante meses.
50

Tinción de las muestras

Tinción para observación con microscopio de campo claro

- Mezclar solución de Wright con tampón de fosfato (1:1), y depositar una capa de tinción, horizontalmente, que cubrirá el microgel seco. Dejar que tiña durante 5-10 minutos, soplando encima ocasionalmente. Decantar, lavar suavemente con agua corriente y dejar secar. Si la tinción es excesiva, se puede desteñir en etanol, secar y teñir otra vez. Si la tinción es débil, particularmente en los halos, se puede teñir otra vez directamente con más solución de Wright.
55
- Otra posibilidad es la incubación durante 5 minutos, verticalmente, en una jarra Coplin con solución Hemacolor 2 (Merck 1.11956), dejar que escurra verticalmente durante 10 segundos e incubar posteriormente en otra jarra Coplin, verticalmente, con solución Hemacolor 3 (Merck 1.11957), durante 5 minutos. Finalmente lavar suavemente en agua destilada y dejar secar. Si se desea una preparación permanente, ésta se puede montar en Entellán.
60
65

ES 2 337 592 T3

Tinción para observación con microscopio de fluorescencia:

Dependiendo de la variabilidad de los filtros de fluorescencia, las muestras se pueden teñir con fluorocromos específicos para ADN del tipo DAPI, Hoechst 33258, Bromuro de Etidio, Yoduro de Propidio, etc., en un medio antidesvanecimiento (por ejemplo Vectashield, Vector, ref: H-1000).

Seguridad y medio ambiente

- 10 Evitar inhalación y contacto con las soluciones suministradas.
- Las soluciones B y C contienen ácido clorhídrico, ditiotreititol y Triton X-100.
- Consultar las especificaciones suministradas por los fabricantes.
- 15 No desechar los productos utilizados al medio ambiente. Ajustarse a la normativa del Centro para el almacenamiento y desechado de productos tóxicos.
- 20 Las muestras biológicas deben ser manejadas como potencialmente infecciosas.

Almacenamiento y estabilidad

25 Almacenar a temperatura ambiente, excepto la solución C que se tiene que almacenar a 4°C. Caducidad: los reactivos y materiales son estables durante un periodo mínimo de 6 meses. Se recomienda que las soluciones B y C se mantengan en posición vertical y bien cerradas.

30 La presente invención tiene distintos campos en los que es relevante su aplicación. Su utilización en aplicaciones humanas es obvia. Por ejemplo, en muestras de individuos infértiles cuyos parámetros del seminograma son normales, en parejas con abortos repetidos, en muestras utilizadas para reproducción asistida, en muestras que se van a congelar (crio-conservación) para su futura utilización en técnicas de reproducción asistida debidas a una extirpación del testículo. También en pacientes sometidos a quimioterapia y/o radioterapia por patologías oncológicas, y antes de la realización de una vasectomía.

35 El estudio realizado con el procedimiento y el Kit de la invención puede mejorar los criterios de selección de aspirantes a donante de semen, así como complementar la evaluación periódica de las muestras de los donantes, en los bancos de semen. También es posible analizar el efecto de la edad avanzada sobre la calidad del semen y la fertilidad. Es interesante su aplicación para la evaluación de pacientes con patologías que podrían afectar a la integridad de los espermatozoides: fiebre, infecciones, varicocele, estrés, exposición a agentes genotóxicos en el trabajo o accidental (plaguicidas, radiación, estrógenos ambientales, etc.), tratamientos hormonales, o exposición reiterada al calor elevado (profesiones en relación con altos hornos, cerámica, vidrio, o conductores de vehículos). Estos individuos también pueden ser evaluados periódicamente. Por último, la invención es útil en investigación básica y clínica.

45 De manera similar, la invención también es de utilización en laboratorios veterinarios. Es posible estudiar el nivel de fragmentación del ADN de los espermatozoides en diferentes especies animales, por ejemplo en machos reproductores, en muestras almacenadas, en procesos patológicos, en machos de especies en peligro de extinción y en la valoración del daño provocado por agentes tóxicos.

Ejemplos

50 La invención se describirá sobre la base de algunos ejemplos que ilustrarán con más detalle algunas de las características previamente descritas.

Ejemplo 1

55 En una muestra de semen reciente, se aplica la metodología descrita para producir halos de dispersión de la cromatina. Para ello, la muestra diluida a una concentración de 10 millones por mililitro, en PBS, se mezcló con agarosa líquida de bajo punto de gelificación al 1%, para obtener una concentración final de esta última del 0.7%. Tras gelificar el microgel sobre el portaobjetos, la muestra se incubó a 22°C durante 8 minutos en la solución desnaturalizante compuesta por HCl 0,08 M, y luego en la solución de lisis constituida por NaCl 2,5M, DTT 0,2M, Tris 0,2M, Triton X-100 1%, pH 7,5, durante 25 minutos, a 22°C. Los portaobjetos se lavaron en agua destilada durante 5 minutos, se deshidrataron en baños de etanol, y se secaron al aire. A continuación, de manera secuencial y sobre las mismas células, se realizó DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence *In Situ* Hybridization; Fernández *et al.*, 1998; 2000; 2002; Fernández y Gosálvez, 2002) utilizando una sonda de ADN genómico total. Este procedimiento posibilita la detección y cuantificación de las roturas del ADN en núcleos de células sumergidas en microgel de agarosa, desproteinizadas y sometidas a una desnaturalización controlada del ADN. Esta desnaturalización produce tramos de ADN

ES 2 337 592 T3

de cadena sencilla a partir de los extremos de rotura, los cuales son detectados mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda de ADN genómico total marcada con un fluorocromo que emite fluorescencia roja (Cy3). Cuanto mayor es el número de roturas en el ADN celular, mayor es la calidad del ADN de cadena sencilla producido por la solución desnaturalizante, mayor es la cantidad de sonda hibridada y mayor es la fluorescencia roja obtenida. Las muestras procesadas según el procedimiento de la presente invención contienen ADN de cadena sencilla, producido por la solución desnaturalizante, a partir de los posibles extremos de rotura que tiene el ADN. Por lo tanto, la intensidad de la hibridación que utiliza la sonda de ADN genómico total, estará en relación con la cantidad de roturas presentes en el núcleo del espermatozoide.

Se contaron 250 células obtenidas al azar. Las imágenes teñidas mediante DAPI de los halos de dispersión de la cromatina, se capturaron utilizando una cámara CCD refrigerada utilizando dos filtros para visualizar los halos de dispersión, visibles en azul, y de la señal de hibridación, visible en rojo, simultáneamente. El fin último era establecer una correlación entre el tamaño de los halos de dispersión de la cromatina y el nivel de marcador de las roturas de ADN. Los resultados demostraron una correlación inversa entre el área relativa de los halos de dispersión de la cromatina y la intensidad de marcador de las roturas del ADN utilizando DBD-FISH (Tabla 1).

TABLA 1

HALO GRANDE	Área halo/total	DMtotal
Media	0,85	13,07
Desviación estándar	0,05	7,35
Cuenta	154	154
HALO MEDIANO	Área halo/total	DMtotal
Media	0,73	24,85
Desviación estándar	0,07	12,52
Cuenta	38	38
HALO PEQUEÑO	Área halo/total	DMtotal
Media	0,48	180,28
Desviación estándar	0,14	117,82
Cuenta	22	22
SIN HALO	Área halo/total	DMtotal
Media	-	407,34
Desviación estándar	-	252,69
Cuenta	29	29
DEGRADADAS	Área halo/total	DMtotal
Media	-	101
Desviación estándar	-	86
Cuenta	7	7

Nótese que a medida que disminuye el área relativa del halo, se produce un aumento en la densidad media (DM) total de la hibridación.

ES 2 337 592 T3

Como resultado, la simple determinación del tamaño de los halos de dispersión de la cromatina, obtenidos utilizando el procedimiento de los autores de la presente, ofrece una estimación simple y directa de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides humanos.

5

Ejemplo 2

Método complementario para la evaluación de donantes de semen utilizado en técnicas de reproducción asistida

10 En una clínica de reproducción asistida, se tomaron 10 muestras de donantes de semen. Como complemento del espermiograma habitual, se determinó el nivel de fragmentación de ADN en dichas muestras. Se contaron 500 células por individuo. En este caso, los resultados se obtuvieron aplicando la prueba de halos de dispersión de la cromatina de la invención. Las muestras se incluyeron en el microgel de agarosa, se incubaron en las soluciones ácida y de lisis, se lavaron, se deshidrataron y se dejaron secar, como se describe en el ejemplo 1. La tinción, en este caso, no se hizo con DAPI sino con la tinción de Wright, para microscopía de campo claro. Para ello se mezcló la solución de Wright con solución tampón de fosfato (1:1), y se colocó una capa de tinción, horizontalmente, cubriendo el microgel seco. Se tiñó durante 5-10 minutos, soplando encima ocasionalmente. Tras un lavado en agua corriente, se dejó secar y se visualizaron los nucleoides. Los resultados se muestran en la Tabla 2. El nivel de fragmentación medio estimado en este grupo fue menor del 20% en todos los casos (15,4 +/- 3,1).

20

TABLA 2

25

nº muestra	% Células halo grande	% Células halo mediano	% Células halo pequeño	% Células sin halo	% Células degradadas	% Células fragmentadas
n1	76,2	7,4	10,2	5,0	1,2	16,4
n2	74,4	7,0	11,2	7,4	-	18,6
n3	72,6	16,4	6,2	4,8	-	11,0
n4	78,6	6,0	7,4	6,6	1,4	15,4
n5	81,6	5,8	7,0	5,4	0,2	12,6
n6	69,4	11,0	12,6	6,0	1,0	19,6
n7	73,2	7,2	9,6	8,8	1,2	19,6
n8	80,2	5,4	8,4	5,0	1,0	14,4
n9	85,2	2,6	5,0	6,8	0,4	12,2
n10	79,8	5,6	6,8	7,0	0,8	14,6

50

Distribución de los porcentajes de las categorías de tamaño de los halos obtenidos en 10 donantes de semen. El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado comprende la suma de las categorías de espermatozoides con halo pequeño, sin halo y sin halo-degradados.

55

60

65

ES 2 337 592 T3

Ejemplo 3

Evaluación clínica de pacientes infértiles

5 En una clínica de reproducción asistida, se tomaron 17 muestras de donantes de semen. Como complemento del espermiograma habitual, se determinó el nivel de fragmentación de ADN en dichas muestras. Se contaron 500 células por individuo. Como en el ejemplo anterior, los resultados se obtuvieron aplicando la prueba de halos de dispersión de la cromatina de la invención. Los resultados se muestran en la Tabla 3. El nivel de fragmentación medio en este grupo fue mayor del 20% en todos los casos (49,9 +/- 20,7).

TABLA 3

Nº Muestra	% Células halo grande	% Células halo mediano	% Células halo pequeño	% Células sin halo	% Células degradadas	% Células fragmentadas
p1	47,0	12,0	16,2	22,4	2,4	41,0
p2	38,4	3,2	15,2	42,2	1,0	58,4
p3	39,6	1,6	13,2	44,6	1,0	58,8
p4	53,4	10,6	11,0	17,6	7,4	36,0
p5	42,4	5,2	15,2	35,8	1,4	52,4
p6	50,0	5,8	10,0	32,9	1,2	44,2
p7	39,0	11,2	22,6	21,2	6,0	49,8
p8	60,6	4,8	9,4	22,8	2,4	34,6
p9	69,4	3,2	7,4	19,0	1,0	27,4
p10	60,6	4,4	10,4	24,0	0,6	35,0
p11	11,3	3,0	6,0	75,8	4,0	85,8
p12	65,6	4,2	2,4	24,4	3,4	30,2
p13	16,7	11,9	24,3	46,8	0,3	71,4
p14	8,4	4,4	18,6	67,0	1,6	87,2
p15	64,7	8,2	11,2	13,7	2,2	27,1
p16	14,6	5,0	10,6	63,4	6,4	80,4
p17	65,8	5,8	9,4	17,4	1,6	28,4

55 Distribución de los porcentajes de las categorías de tamaño de los halos obtenidos en 17 pacientes. El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado comprende la suma de las categorías de espermatozoides con halo pequeño, sin halo y sin halo-degradados.

ES 2 337 592 T3

Ejemplo 4

Se utilizó la invención para evaluar el daño toxicológico que afecta a espermatozoides humanos. Daño por agentes exógenos y endógenos. Como ejemplo ilustrativo se presenta un estudio que analizó el daño del ADN inducido por un agente químico donante de óxido nítrico (NO). Para ello, partes alícuotas de 50 microlitros de una muestra de semen totalmente reciente de un individuo normal, se incubaron durante 1 hora, a temperatura ambiente, con diferentes dosis de nitroprusiato sódico (SNP). A continuación, las muestras tratadas se centrifugaron suavemente, eliminando el sobrenadante, para lavar el SNP. Tras resuspender en PBS, las muestras se procesaron según el procedimiento descrito en la presente invención.

Los resultados se presentan en la Tabla 4. Se observó que a medida que se aumentaba la concentración del donante de NO, aumentaba el porcentaje de espermatozoides con cromatina/ADN dañada.

TABLA 4

Concen- tración de SNP (microM)	% Células halo grande	% Células halo mediano	% Células halo pequeño	% Células sin halo	% Células degradadas	% Células fragmentadas
0,0	61,8	14,1	12,0	12,1	0,0	24,1
62,5	38,0	23,2	19,6	19,2	0,0	38,8
125	21,8	24,2	32,6	23,1	0,0	55,7
250	14,9	19,0	40,3	30,1	0,0	70,4
500	3,8	22,5	39,6	34,1	0,0	73,7

Distribución de los porcentajes de las categorías de tamaño de los halos obtenidos en una muestra de semen tratada con distintas concentraciones de un agente donante de óxido nítrico (SNP), con capacidad para producir daño en el ADN. El porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado comprende la suma de las categorías de espermatozoides con halo pequeño, sin halo y sin halo-degradados.

Ejemplo 5

Reproducibilidad del ensayo utilizando muestras de semen congelado

Se estudiaron dos factores que podrían afectar a la calidad de las muestras, como son la congelación y la dilución, utilizando la metodología de análisis del grado de dispersión de los halos de cromatina. Para ello se analizaron 4 muestras recientes de donantes distintos, y se congelaron partes alícuotas en nitrógeno líquido. El análisis de las muestras se realizó mediante el recuento visual directo de los distintos tipos de nucleoides (500 células), sobre dos portaobjetos distintos y un mínimo de dos veces, por muestra y punto experimental.

Reproducibilidad de los conteos. Se calculó el coeficiente de correlación intraclase (R) para las distintas mediciones que se realizaron sobre cada portaobjetos. Los resultados de los índices para cada tipo celular y los cálculos con el promedio de dos conteos oscilaron entre valores de 0.78 y 0.92, y dado que los valores de R oscilan entre 0 y 1, se demuestra que se obtiene una elevada reproducibilidad (Tabla 5).

TABLA 5

	Media	Intervalo de confianza 95%
Diferencia % células halo grande	-0,78	(-1,98; 0,42)
Diferencia % células halo mediano	0,56	(-0,17;1,29)
Diferencia % células halo pequeño	0,36	(-0,48;1,20)
Diferencia % células sin halo	-0,19	(-0,88;0,50)
Diferencia % células sin halo degradadas	0,04	(-0,35;0,43)
Diferencia % células con ADN fragmentado	0,21	(-0,67;1,09)

ES 2 337 592 T3

Congelación. Los resultados obtenidos se comparan utilizando un análisis de varianza de dos factores (método de conservación y muestra). Se demostró que no había diferencias significativas ($p > 0.05$) en el nivel de fragmentación de las muestras procesadas recientes y congeladas en nitrógeno líquido. El tiempo de congelación tampoco resultó que afectara a la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado (Tabla 6).

TABLA 6

Muestra	Estado de la muestra	Media	Desviación estándar
1	M. Reciente	19,58	0,22
	M. Congelada	20,20	1,48
2	M. Reciente	13,38	1,87
	M. Congelada	13,39	1,86
3	M. Reciente	12,75	3,04
	M. Congelada	11,53	1,92
4	M. Reciente	22,13	0,74
	M. Congelada	21,56	2,68

En conclusión, se demuestra la reproducibilidad de los resultados obtenidos tras el análisis visual directo.

Ejemplo 6

Análisis de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides humanos utilizando la variación del orden de incubación de las soluciones de desnaturalización y de lisis:

En esta variación, tras colocar los espermatozoides en los microgeles de agarosa, se incuban, en una primera etapa, en la solución de lisis descrita en el Kit, durante 25 minutos, a 22°C. A continuación, los portaobjetos se sumergen en la solución desnaturalizante compuesta por HCl 0,08 M, durante 8 minutos, a 22°C. Finalmente, tras el lavado en agua destilada, los portaobjetos son deshidratados y teñidos con la solución de Wright, y son observados utilizando microscopio de campo claro.

Utilizando esta variación técnica, los espermatozoides con ADN fragmentado se comportan de modo diferente. En este caso, dispersan fragmentos de cromatina/ADN, dando lugar a halos de mayor tamaño.

Ejemplo 7

Resultados de la aplicación de la metodología sobre muestras de esperma de distintos animales

Con objetivo de evaluar el carácter universal de la metodología que se propone, se seleccionaron individuos macho de distintas especies para realizar un estudio de los niveles de fragmentación del ADN en los espermatozoides y la visualización paralela de su cola como elemento celular distintivo. Se tomaron muestras de espermatozoides de las siguientes especies: ratón (*Mus musculus*), toro (*Bos taurus*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y lombriz de tierra (*Lombricus terrestris*). En todas las especies, la aplicación de la técnica produjo halos de dispersión de la cromatina en los espermatozoides y se pudieron reconocer las colas de los mismos, tanto de los que tenían ADN normal como de aquellos que lo tenían fragmentado (Figura 4). La forma de los espermatozoides y el tipo de halo producido, son característicos de cada especie (4a corresponde a toro; 4b,c,d corresponden a ratón; 4e corresponde a la lombriz de tierra; 4f corresponde al rodaballo). La morfología del espermatozoide, tanto el que contiene ADN fragmentado como el que no, es distinta entre las especies y distinta a su vez a la encontrada en humanos. En todos los casos, la dispersión de la cromatina es paralela y comparable a la encontrada en el caso de muestras de esperma humano. Es decir, se producen halos de dispersión de la cromatina de distinto tamaño y se puede visualizar la cola del espermatozoide.

Se estudió la morfología y el tamaño de los halos en las distintas especies y los resultados obtenidos fueron los siguientes.

ES 2 337 592 T3

En el caso del toro, se analizaron muestras independientes utilizando 5 observadores distintos. En este caso, se encontraron diferencias en el porcentaje de núcleos espermáticos con ADN fragmentado por cada individuo, pero no se observaron diferencias entre los porcentajes obtenidos por cada observador (Tabla 7).

5

TABLA 7

	TOTAL	% Grande	% Mediano	% Pequeño	% Sin halo	% Degradadas	% Fragmentadas
10	Ob1-500	75,8	9,8	7,2	7,2	0	14,4
15	Ob2-500	77	7,2	12	3,6	0,2	15,8
	Ob3-500	77	8	9,8	5	0,2	15
20	Ob4-500	72,8	11,4	8,8	7	0	15,8
	Ob5-500	73	11,2	8,2	7,6	0	15,8
	500	75,1	9,4	9,1	5,9	0,1	15,3
25	Ob1-500	80,6	10	6,2	3,2	0	9,4
	Ob3-500	82,2	8	6	3,8	0	9,8
	Ob4-500	82,4	8,4	6,2	3	0	9,2
30	500	81,7	8,8	6,1	3,3	-	9,5
	Ob1-500	71,2	6,2	10,8	11,4	0,4	22,6
	Ob2-500	70,8	4,6	14	10,6	0	24,6
35	Ob3-500	75	5,6	12	7,2	0,2	19,4
	Ob5-500	72,2	6,8	14,2	6,4	0,4	21
	500	72,3	5,7	12,7	8,6	0,3	21,8
40	Ob2-500	85,2	8,4	3,8	2,6	0	6,4
	Ob3-500	84,4	10	3,2	2,4	0	5,6
	Ob4-500	80,8	12,8	4	2,4	0	6,4
45	500	83,4	10,2	3,7	2,5	0	6,1

50 En el caso del ratón, se utilizaron dos cepas distintas, una normal (M1-32NNC) y otra consanguínea (M2-32BC). Los porcentajes obtenidos para los distintos tipos de halo muestran claras diferencias entre una cepa normal (7,1) y la consanguínea (25,1) (Tabla 8).

55

TABLA 8

	TOTAL	% Grande	% Mediano	% Pequeño	% Sin halo	% Degradadas	% Fragmentadas
60	M2-32BC	63	11,5	18,1	6,9	0,1	25,1
65	M1-32NNC	86,2	6,5	4,6	2,5	0,2	7,1

ES 2 337 592 T3

En el caso específico del rodaballo, se podían distinguir espermatozoides que presentaban un halo de dispersión de la cromatina grande y un centro pequeño, frente a aquellos que presentaban un halo de dispersión pequeño y a un centro grande y finalmente, otros sin halo de dispersión. Los resultados se exponen en la Tabla 9.

5

TABLA 9

% Halo Grande/ Centro Pequeño	% Halo Pequeño/ Centro Grande	% Sin Halo Solo Cabeza
94	5,6	0,4
92,8	7	0,2
95,6	4	0,4
94,1	5,4	0,3
72,2	25,2	2,6
71,6	25,4	3
77	20,2	2,8
73,6	23,5	2,8
75,2	18,4	6,4
71,2	22	6,8
78	15	7
74,7	18,2	6,7

40 En el caso de la lombriz de tierra, se produce una generación dinámica de halos similar a la descrita en los casos previos, y en este caso también se puede distinguir perfectamente la cabeza del espermatozoide y su cola. El porcentaje estimado de espermatozoides que contienen ADN fragmentado en 2 individuos estudiados (uno joven y uno maduro) fue de un 15% y un 22%, respectivamente. En este caso, aparecen cabezas de espermatozoides con una formación parcial de halos, cuyo significado está actualmente en fase de investigación (véase Figura 4 e).

45

Ejemplo 8

50 *Visualización de la misma preparación citológica de halos de dispersión de la cromatina, colas de espermatozoides y leucocitos. Evaluación del efecto de la leucocitospermia sobre la integridad del ADN en muestras de esperma*

55 La leucocitospermia es un proceso invasivo no deseado que conduce al aumento anómalo de leucocitos en muestras de fluido seminal ($> 5 \times 10^6/\text{ml}$). Se ha detectado leucocitospermia entre 10% y 20% de varones infértiles. Parece ser que tanto los neutrófilos como los macrófagos presentes en el semen, pueden generar ERO (especies reactivas del oxígeno) que provocan estrés oxidativo y dan como resultado daño del ADN en los espermatozoides (Omu *et al.*, 1999; Erenpreiss *et al.*, 2002; Henkes *et al.*, 2003). De hecho, la leucocitospermia se ha asociado con distintas anomalías de los parámetros clásicos utilizados en el análisis de la calidad del esperma. Por ejemplo, mientras que la incidencia de espermatozoides anómalos concurre sólo en el 47% de las muestras de individuos sin leucocitospermia, el porcentaje aumenta a 88% cuando esta leucocitospermia está presente (www.clevelandclinic.org).

60

65 En una muestra de 5 pacientes, con presencia de altos niveles de leucocitospermia de distinta etiología (prostatitis e infecciones por *Chlamydomonas* y agentes bacterianos), se estudió la respuesta a la técnica para diferenciar, de forma inequívoca, el porcentaje de leucocitos presentes en las muestras de semen y los niveles de fragmentación del ADN en los espermatozoides de esas mismas muestras. La diferencia, entre ambos tipos celulares, cuando las muestras se someten al mismo tratamiento, es clara, dado que tanto los espermatozoides con ADN fragmentado como los que no lo tienen, muestran la cola que los caracteriza. La ausencia de cola en los leucocitos, posibilita diferenciarlos del resto de los tipos celulares (Figura 5).

ES 2 337 592 T3

De esta manera, se puede establecer una correlación directa entre número de leucocitos por muestra y los niveles de fragmentación del ADN en los espermatozoides. La Tabla 10 muestra el nivel de leucocitos en muestras de semen en 5 pacientes afectados por leucocitospermia de distinta etiología y los porcentajes de espermatozoides con ADN normal (halo grande y mediano G/M) y fragmentado (halo pequeño y sin halo P/SH).

TABLA 10

	% Leucocitos	% Células halo (G/M)	% Células halo (P/SH)
Muestra 1	6,1	73,9	20
Muestra 2	15,5	55,3	29,2
Muestra 3	17	48,2	34,8
Muestra 4	22	31,7	46,3
Muestra 5	25,6	30,5	43,9

Referencias

- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D (1998)** Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59:1037-1046.
- De Jonge C (2002)** The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. *Hum. Fertil.* 5:51-53.
- Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J and Erenpreisa JJ (2002)** Effect of Leukocytospermia on Sperm DNA Integrity: A Negative Effect on Abnormal Semen Samples. *Journal of Andrology* 23: 5.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, and Melamed, MR (1980)** Relation of mammalian sperm heterogeneity to fertility. *Science.* 210:1131-1133.
- Evenson DP and Jost LK (1994)** Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. In: Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA, eds. *Methods in Cell Biology.* Vol 42. Flow Cytometry. 2nd ed. Orlando, Fla: *Academic Press*; 42:159-176.
- Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R (2000)** Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J. Androl.* 21: 739-746.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999)** Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 14:1039-1049.
- Evenson DP, Larson KJ, Jost LK (2002)** Sperm Chromatin Structure Assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 23:25-43.
- Fernández JL, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, Gosálvez J (1998)** Application of FISH for *in situ* detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet. Cell Genet.* 82:251-256.
- Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, de la Torre J, Gosálvez J (2000)** DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat. Res.* 453:77-82.
- Fernández JL, Gosálvez J (2002)** Application of FISH to detect DNA damage: DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol. Biol.* 203:203-216.
- Fernández JL, Goyanes V, Gosálvez J (2002)** DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH). In: Rautenstrauss B, Liehr T, eds. *FISH technology-Springer lab manual.* Heidelberg: Springer-Verlag; 282-290.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Alvarez JG (2003)** The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 24: 59-66.
- Henkel R, Maass G, Hajimohammad M, Menkveld R, Stalf T, Villegas J, Sanchez R, Kruger TF, Schill WB. (2003)** Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. *Andrologia.* 35:309-13.

ES 2 337 592 T3

Larson KL, DeJonge C, Barnes A, Jost L, and Evenson DP (2000) Relationship between assisted reproductive techniques (ART) outcome and status of chromatin integrity as measured by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Hum. Reprod.* 15:1717- 1722.

5 **Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z (1993)** Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53:945-951.

10 **Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W (1996)** A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod.* 2:613-619.

15 **Omu AE, Al-Qattan F, Al-Abdul-Hadi FM, Fatinikun MT, Fernandes S. (1999)** Seminal immune response in infertile men with leukocytospermia: effect on antioxidant activity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 86:195-202 (1999)

20 **Sailer BL, Jost LK, Evenson DP (1995)** Mammalian sperm DNA susceptibility to *in-situ* denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the deoxynucleotidyl transferase assay. *J. Androl.* 16:80-87.

25 **Sumner AT (1990)** Chromosome banding. Unwin Hyman, London.

30 World Health Organization (1999) WHO laboratory manual for the examination of the human semen and semen-cervical mucus interaction. Cuarta Edición, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 337 592 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para evaluar la integridad de la cromatina/ADN y de los espermatozoides de un animal que comprende:
- a). una etapa de tratamiento de la muestra que contiene los espermatozoides, con una solución desnaturalizante del ADN,
 - 10 b). una única etapa de tratamiento con una solución de lisis para extraer las proteínas nucleares, en la que el detergente que está comprendido en dicha solución de lisis es un detergente no iónico, no desnaturalizante de proteínas, y
 - 15 c). una etapa de evaluación de la integridad de la cromatina/ADN de los espermatozoides basada en la medición del tamaño de halo de los espermatozoides.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el detergente no iónico se selecciona entre el grupo toctilfenoxipolietoxietanol (Triton-X100), N,N-bis(3-D-gluconamidopropil) colamida (bigCHAP), Brij(r) 35 P, N-decanoil-N-metilglucamina, digitonin, dodecanoil-N-metilglucamida, heptanoil-N-metilglucamida, octilfenoxi poly(etileneoxi)etanol ramificado (Igepal CA-630), N-Nonanoil-N-metilglucamina, Nonidet P 40, N-Octanoil-N-metilglucamina, solución Span 20, polisorbato 20 (Tween 20) y sus mezclas, preferentemente Triton-X 100.
- 25 3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1-2 **caracterizado** porque la solución de lisis comprende cloruro sódico entre 1 y 3 M, ditioneitol (DTT) entre 0,001 y 2M, 2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) entre 0,001 M y 2 M y Triton X-100 entre 0,1% y 3%.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1-3 **caracterizado** porque la solución de lisis comprende cloruro sódico 2,5 M, DTT 0,2 M, Tris 0,2 M, Triton-X 1% y pH de 7,5.
- 30 5. Procedimiento según las reivindicaciones 1-4 **caracterizado** porque la solución desnaturalizante del ADN es ácida.
6. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque la solución desnaturalizante del ADN comprende un ácido seleccionado entre el grupo ácido clorhídrico, acético, nítrico o mezclas de éstos.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque la solución desnaturalizante del ADN comprende ácido clorhídrico.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 1-7 **caracterizado** porque después de las etapas a) y b) hay una etapa de tinción de la muestra.
- 40 9. Procedimiento según la reivindicación 8 **caracterizado** porque la tinción se hace con una solución tipo Wright.
10. Procedimiento según las reivindicaciones 1-9 **caracterizado** porque la muestra que contiene los espermatozoides se incluye en un medio similar a una suspensión, preferentemente en un microgel.
- 45 11. Procedimiento según la reivindicación 10 **caracterizado** porque la muestra que contiene los espermatozoides se incluye en un microgel de agarosa.
- 50 12. Uso de una solución desnaturalizante del ADN y una solución de lisis en el procedimiento de la reivindicación 1, en el que el detergente que está comprendido en dicha la solución de lisis es un detergente no iónico, no desnaturalizante de proteínas.
- 55 13. Uso, según la reivindicación 12, **caracterizado** porque la solución de lisis comprende cloruro sódico entre 1 M y 3 M, ditioneitol (DTT) entre 0,001 M y 2 M, 2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) entre 0,001 M y 2 M y Triton X-100 entre 0,1% y 3%.

60

65

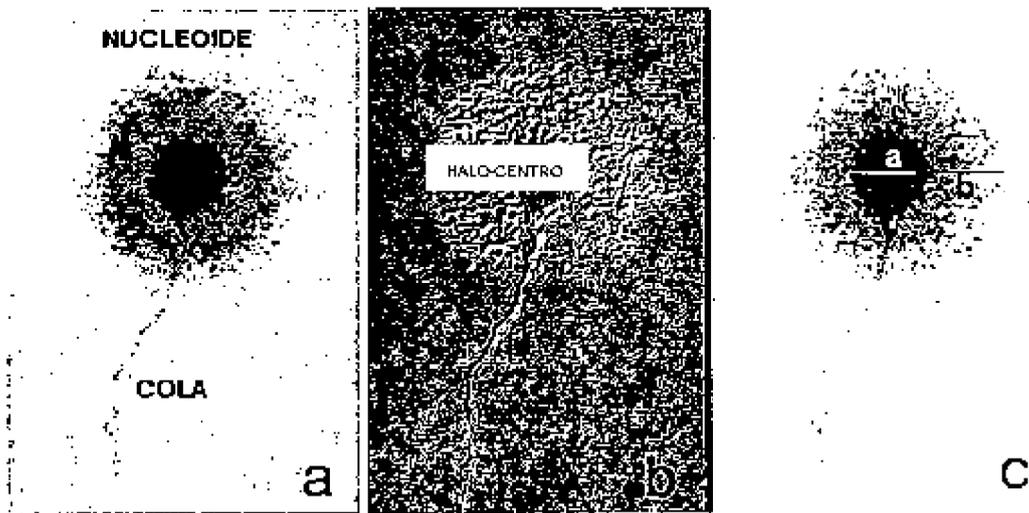


FIG. 1

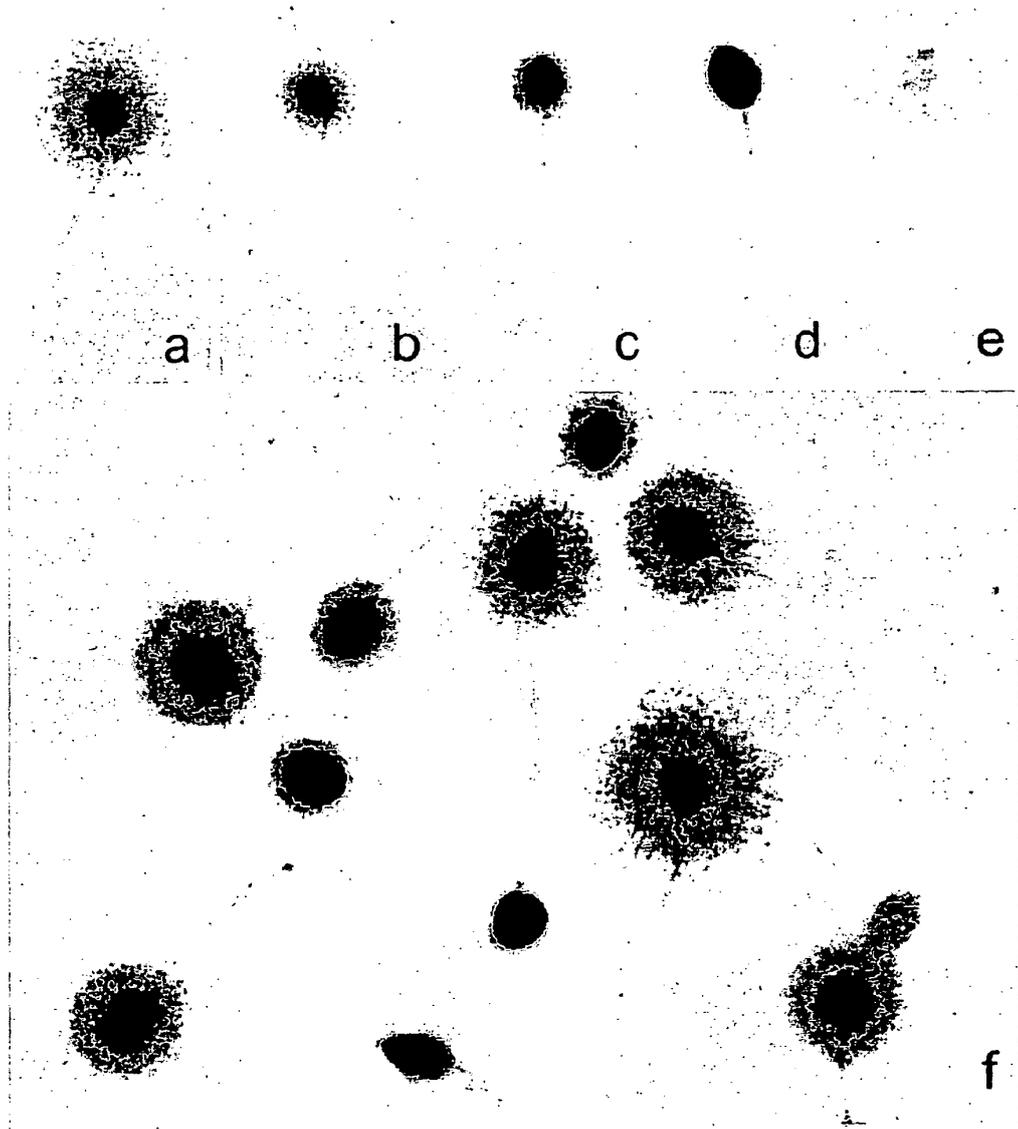


FIG. 2

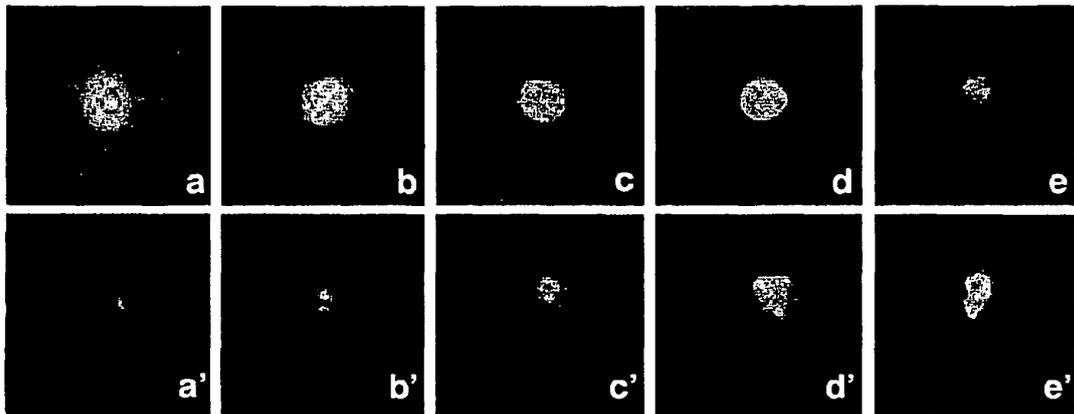


FIG. 3

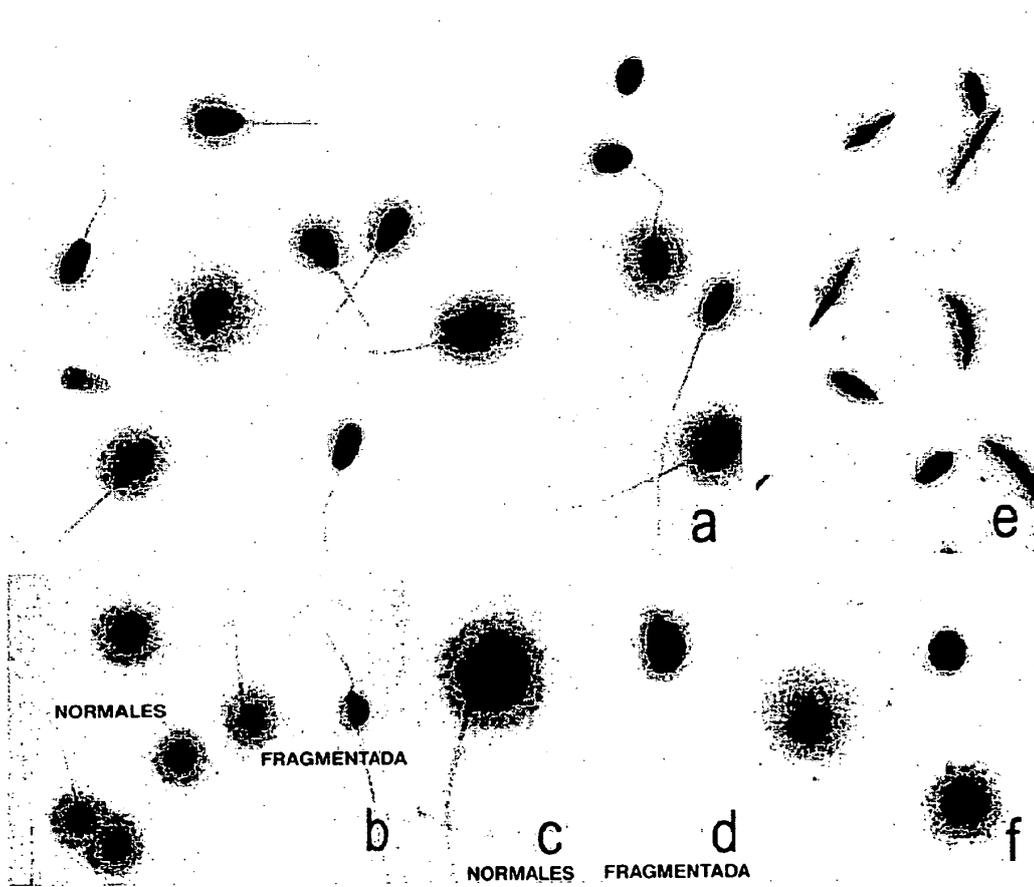


FIG. 4

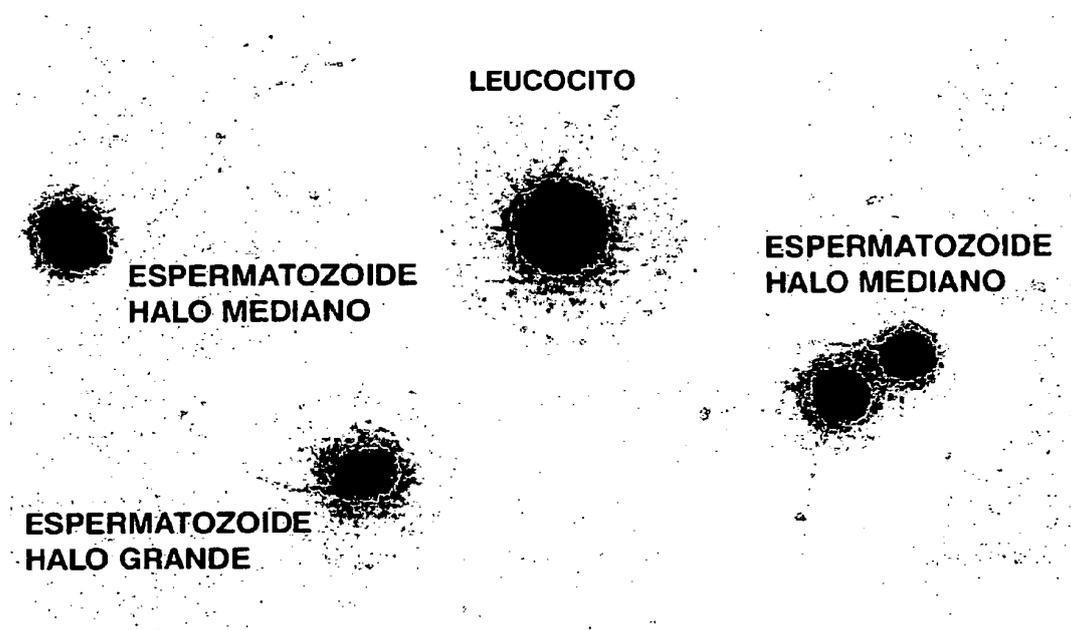


FIG. 5