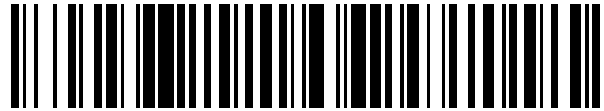


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 963**

21 Número de solicitud: 201330984

51 Int. Cl.:

**G01N 33/52** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**02.07.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**12.11.2013**

Fecha de la concesión:

**21.04.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**28.04.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE LEÓN (100.0%)  
Avda. de la Facultad No. 25  
24071 León (León) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ PASTOR, Felipe**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **Procedimiento para eliminar partículas no espermáticas en una muestra de semen obtenida de un animal**

57 Resumen:

Procedimiento para eliminar partículas no espermáticas en una muestra de semen obtenida de un animal en el que se realiza un análisis de la estructura de la cromatina espermática por citometría de flujo, donde dicho análisis comprende la desnaturalización ácida del ADN y posterior tinción con naranja de acridina del ADN, que comprende: excitar dicha muestra con un láser que emite luz de longitud de onda entre 400 y 535 nm, detectar la fluorescencia verde y naranja emitida por la muestra con dos fotodetectores, utilizar los valores de fluorescencia verde y naranja para discriminar partículas espermáticas de partículas no espermáticas y eliminar las partículas no espermáticas del análisis. Dicho animal puede ser un mamífero, por ejemplo, oveja, cerdo, cabra, vaca, caballo y humano.

ES 2 428 963 B2

**PROCEDIMIENTO PARA ELIMINAR PARTÍCULAS NO ESPERMÁTICAS EN UNA  
MUESTRA DE SEMEN OBTENIDA DE UN ANIMAL**

**DESCRIPCIÓN**

5

**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un procedimiento para discriminar y eliminar partículas contaminantes en el análisis de la cromatina espermática mediante tinción con naranja de acridina y citometría de flujo.

El procedimiento de la invención es aplicable en los sectores o actividades relacionadas con el uso y análisis de espermatozoides, especialmente en el campo de la andrología y de las tecnologías de reproducción asistida

15

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La citometría de flujo es una tecnología basada en la utilización de un haz láser para el análisis de células suspendidas en un fluido, el cual arrastra las células, exponiéndolas brevemente al haz láser. Una serie de fotodetectores recoge la luz dispersada o emitida por las células, permitiendo su clasificación en función de distintos factores. Generalmente, las células son previamente marcadas con compuestos fluorescentes o con moléculas marcadoras (e.g., anticuerpos) que tienen asociados marcadores fluorescentes.

Esta tecnología ha cobrado una gran importancia en andrología. Se han desarrollado numerosas técnicas para el análisis mediante citometría de flujo de espermatozoides humanos y de otros animales, tanto domésticos como silvestres, utilizándose para estimar la concentración espermática, la viabilidad, la funcionalidad de distintos orgánulos o la integridad de la cromatina espermática. Aunque gran parte del uso está orientado a la investigación, algunas clínicas y centros de cría animal disponen ya de citómetros de flujo para la realización rutinaria de estos análisis. Hay que destacar la utilización de esta técnica en el sexaje de semen, utilizada sobre todo en ganado bovino.

Una de las técnicas más establecidas en el análisis de la calidad espermática es el análisis de la estructura de la cromatina espermática mediante citometría de flujo (SCSA<sup>®</sup>, *Sperm Chromatin Structure Assay*). Los espermatozoides se someten a un paso de

desnaturalización ácida del ADN, seguido por la tinción con el fluorocromo naranja de acridina, un agente metacromático intercalante en el ADN. El naranja de acridina es excitado con luz cyan (máxima a 502 nm) y emite fluorescencia verde cuando se intercala en ADN de doble hélice (máxima a 525 nm), y fluorescencia roja si se intercala en ADN de hélice sencilla (máxima a 640 nm). Dado que el ADN de hélice sencilla se presenta en zonas propensas a la desnaturalización, que coincidirían con roturas de la hebra o con otras alteraciones de la cromatina, se calcula un índice de fragmentación del ADN (DFI) como la relación entre la fluorescencia roja del núcleo y la fluorescencia total. Esta técnica es posiblemente la más estandarizada y que ha sido objeto de más estudios en relación con la fertilidad tanto clínica como en campo. Por otra parte, las características de excitación y emisión del naranja de acridina lo hacen propicio para el análisis en la mayor parte de los citómetros de flujo, ya que el equipamiento estándar incluye un láser operando a 488 nm y dos fotodetectores con filtros para detectar luz de color verde (en torno a 530 nm) y roja (por encima de 620 nm).

15

En el análisis de espermatozoides mediante SCSA<sup>®</sup>, uno de los problemas que se plantean es la presencia de partículas no espermáticas (*debris*) o de agregados de células. Este problema aparece en cualquier técnica basada en la citometría de flujo, y se han propuesto diversas metodologías orientadas a o que incluyen métodos para eliminar estas partículas indeseables durante o después del análisis. En el caso del SCSA<sup>®</sup>, Evenson y Jost (Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment, *Methods Cell. Sci.*, 2000, 22, 169–189) describen tres tipos de contaminantes (partículas con baja fluorescencia —que no se corresponden a células—, bacterias y agregados celulares), y proponen la utilización del *gating* (filtrado mediante regiones dibujadas sobre las gráficas proporcionadas por el análisis) para eliminar estas partículas indeseables. Esta propuesta se basa en el hecho de que estas partículas forman poblaciones diferenciadas en el citograma rojo vs. verde, y generalmente suficientemente separadas de la población que corresponde a los espermatozoides.

30 Sin embargo, existen diversos tipos de muestras en las cuales aparecen numerosas partículas no espermáticas cuyo nivel de fluorescencia roja y verde coincide con el de algunas partículas espermáticas. La existencia de estas partículas no espermáticas cuyo nivel de fluorescencia roja y verde coincide con el de algunas partículas espermáticas constituye un problema técnico a resolver, y para el cual el procedimiento descrito por Evenson y Jost (2000) no ofrece una solución.

35

El procedimiento de la invención, descrito en las reivindicaciones, proporciona una solución a este problema técnico.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Una realización es un procedimiento para eliminar partículas no espermáticas en una muestra de semen obtenida de un animal en el que se realiza un análisis de la estructura de la cromatina espermática por citometría de flujo, donde dicho análisis comprende la desnaturalización ácida del ADN y posterior tinción con naranja de acridina del ADN, donde dicho procedimiento comprende:

10

(a) excitar dicha muestra con un láser que emite luz de longitud de onda entre 400 y 535 nm, (b) detectar la fluorescencia verde y naranja emitida por la muestra con dos fotodetectores, (c) utilizar los valores de fluorescencia verde y naranja para discriminar partículas espermáticas de partículas no espermáticas y eliminar las partículas no espermáticas del análisis, en adelante procedimiento de la invención.

15

En el procedimiento de la invención se realiza la eliminación de partículas no espermáticas de los análisis de SCSA<sup>®</sup>, en el caso en que estas solapen con alguna de las poblaciones de partículas espermáticas, de tal manera que su discriminación mediante *gating* sea difícil o imposible. En la presente invención se han encontrado diversos tipos de muestras en las cuales aparecen numerosas partículas no espermáticas cuyo nivel de fluorescencia roja y verde coincide con el de la población espermática caracterizada por tener un DFI incrementado. Estas partículas suelen formar una población en diagonal, más o menos compacta y a la derecha de la población principal (con DFI bajo) de espermatozoides. Por lo tanto, coincide en su posición o cruza el área en el que aparecerían al menos parte de los espermatozoides con DFI moderado o alto.

20

25

La presente invención se diferencia del procedimiento descrito por Evenson y Jost (2000) en la utilización de un tercer fotodetector, además de los dos propuestos por Evenson y Jost (2000) en la técnica (fotodetector de fluorescencia verde y fotodetector de fluorescencia roja). Este fotodetector está configurado para recoger la fluorescencia amarillo-naranja (longitud de onda entre 550 y 620 nm) en modo lineal. En la configuración del fotomultiplicador, el valor de voltaje se fija entre 200 y 700 y el valor de ganancia entre 1 y 5.

30

35

Una vez realizado el análisis de las muestras, se dispone de los valores de fluorescencia naranja de cada partícula, además de los valores de fluorescencia verde y roja. En caso de

que se presenten poblaciones de partículas no espermáticas que solapen con las poblaciones espermáticas (Figura 1), y por tanto no se puedan eliminar utilizando la intensidad de la fluorescencia roja o verde o una relación entre ellas, éstas se pueden discriminar utilizando la información proporcionada por la intensidad de la fluorescencia naranja de cada partícula.

La fluorescencia naranja por si sola no permite discriminar entre partículas espermáticas y no espermáticas, ya que la intensidad de la fluorescencia de ambas poblaciones solapa. Un método sencillo para eliminar las partículas no espermáticas aprovechando los datos de fluorescencia naranja es la representación en un citograma de intensidad de fluorescencia verde vs. intensidad de fluorescencia naranja. En este tipo de citograma (Figura 2), la población correspondiente al *debris* queda definida como una población paralela a la población espermática, siendo posible su eliminación manual o automatizada, aunque la proximidad entre ambas poblaciones requiere la revisión de las dos poblaciones muestra a muestra, y puede conllevar un alto nivel de falsos positivos o negativos.

Estas dos poblaciones pueden separarse de una manera más efectiva utilizando la relación entre las fluorescencias naranja y verde. Por ejemplo, la relación naranja/verde o naranja/[naranja+verde] para cada partícula. Estas relaciones pueden representarse como citogramas verde vs. relación naranja/verde (Figura 3A) o naranja/total, o como un histograma o gráfica de densidad (Figura 3B), consiguiéndose que las partículas no espermáticas formen una población bien definida y bien separada de la población espermática.

Es posible eliminar las partículas no espermáticas utilizando estrategias manuales o automatizadas. En la eliminación manual, en la representación en un citograma o en un histograma, se eliminan los valores correspondientes a partículas no espermáticas utilizando regiones y filtros (*gating*), definiéndolos en cada grupo de datos. En la eliminación automatizada, se puede utilizar el *gating* definiéndolo en una muestra estándar y aplicándolo automáticamente a todas las muestras. No obstante, esta automatización puede no servir en algunos casos en los que hay una alta variación entre muestras, cambiando la localización relativa del *debris*. Otra aproximación es la utilización de algoritmos matemáticos para localización de picos a partir de los datos originales o de las densidades del ratio de fluorescencias (detectando el pico correspondiente al *debris* y eliminándolo automáticamente). Otra aproximación es la utilización de algoritmos de agrupamiento (análisis de *clusters*) los cuales pueden ser de tipo supervisado o no supervisado. Estas

aproximaciones automáticas pueden ser aplicarse simultáneamente, y complementarse con el examen manual.

5 Otra realización es el procedimiento de la invención, donde dicho animal es un mamífero. De forma particular, dicho mamífero está seleccionado del grupo compuesto por oveja, cerdo, cabra, vaca, caballo y humano.

10 Otra realización es el procedimiento de la invención, donde en la etapa (b) dicha fluorescencia naranja se detecta con un fotodetector que recoge la fluorescencia emitida entre 550 y 620 nm.

15 Otra realización es el procedimiento de la invención, donde en la etapa (c) se utiliza la relación entre el valor de la fluorescencia naranja y la fluorescencia verde o la relación entre el valor de la fluorescencia naranja y la suma de los valores de fluorescencia naranja y fluorescencia verde.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 La Figura 1, panel superior, muestra el citograma típico del análisis de la cromatina espermática mediante citometría de flujo tras desnaturalización ácida y tinción con naranja de acridina, cada partícula siendo representado en función de la intensidad de la fluorescencia roja vs. verde. La región señalada dentro del citograma se utilizaría para descartar las partículas indeseables (debris). Los puntos más gruesos indican *debris* cuyas características de fluorescencia roja y verde impiden su eliminación por este método, ya que solapan con la población de espermatozoides (puntos finos dentro de la región). La Figura 1, panel inferior, muestra el citograma obtenido al representar cada partícula (una vez filtrados por la región dibujada en la Figura 1, panel superior) por su valor DFI (DNA Fragmentation Index, obtenido al dividir la intensidad de la fluorescencia roja de cada partícula entre su fluorescencia total [roja+verde] y multiplicar por 100) y por su valor de fluorescencia total (rojo+verde).

35 La Figura 2 muestra un citograma en el que cada partícula es definida utilizando la intensidad de las fluorescencias naranja vs. verde (eventos filtrados utilizando la región definida en la Figura 1, panel superior). Las partículas indeseables (*debris*) se representan como puntos más gruesos.

La Figura 3A muestra un citograma en el que cada partícula es definida utilizando la intensidad de la fluorescencia verde vs. la relación de las intensidades de las fluorescencias naranja y verde (eventos filtrados utilizando la región definida en la Figura 1a). Las partículas indeseables (*debris*) se representan como puntos más gruesos. La Figura 3B  
 5 representa los valores del ratio frente a la densidad de partículas, distinguiéndose los picos correspondientes a los espermatozoides (izquierda) y al *debris* (derecha).

### MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

10 Ejemplo 1. Análisis de la estructura de la cromatina espermática por el procedimiento de la invención en muestras de semen de carneros.

Se realizó un estudio de estrés oxidativo utilizando como modelo espermatozoides de carnero. Las muestras consistieron en dosis de ovino a  $100 \times 10^6$  células/mL, que fueron  
 15 obtenidas de carneros de raza Assaf (Ovigen, Zamora, España) y congeladas en vapores de nitrógeno líquido tras ser diluidas en medio Tris-citrato-fructosa (20% yema de huevo y 4% glicerol). Las dosis (pajuelas de 0,25 mL) se descongelaron en agua a 37 °C durante 30 s. El contenido de 6 dosis se diluyó con 0,5 mL de medio TALP-Hepes y se centrifugó a  $600 \times g$  durante 3 min. Se retiró el sobrenadante y se añadió TALP-Hepes, ajustando la  
 20 concentración a  $25 \times 10^6$  células/mL. Se separó el contenido entre tres tubos, añadiendo a uno de ellos 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  y 100  $\mu\text{M}$  de ascorbato de sodio, y a otro 1 mM de  $\text{FeSO}_4$  y 10 mM de ascorbato de sodio. Los tubos se incubaron durante 6 h para inducir estrés oxidativo y roturas en el ADN. Se transfirieron 400 000 espermatozoides a 200  $\mu\text{L}$  de medio TNE (Tris-NaCl-EDTA) en criotubos, congelándose inmediatamente mediante inmersión en  
 25 nitrógeno líquido. Los criotubos se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. La descongelación se realizó en un baño a 37 °C hasta verificar la desaparición del hielo. Los 200  $\mu\text{L}$  de muestra se transfirieron a tubos de citometría, añadiéndose inmediatamente 400  $\mu\text{L}$  de solución detergente-ácido. 30 s más tarde, se añadieron 1,2 mL de solución de tinción con naranja de acridina, y los tubos se analizaron en un citómetro de flujo  
 30 FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA) tras 3 min. Las soluciones se prepararon como indican Evenson y Jost (2000), y las botellas y tubos se mantuvieron en hielo húmedo en todo momento. El citómetro de flujo estaba provisto de un láser azul ion-argón operando a 488 nm, que se utilizó para excitar el naranja de acridina. La fluorescencia verde se detectó con el fotomultiplicador FL1, tras pasar por un espejo dicroico 560SP, un divisor de haz 90/10 y un filtro 530/30BP. La fluorescencia roja se detectó con el  
 35 fotomultiplicador FL3, tras pasar por un espejo dicroico 640LP y un filtro 670LP. La

- fluorescencia naranja se detectó con el fotomultiplicador FL2, tras pasar por el espejo dicróico 640LP y un filtro 585/42BP. El voltaje de los fotodetectores se ajustó con el software CellQuest v. 3.1 en un ordenador Macintosh provisto del sistema operativo MacOS 9.2. El voltaje fue ajustado siempre según la escala lineal, utilizando una ganancia 1.
- 5 Los fotodetectores FL1 y FL3 fueron ajustados antes de comenzar los análisis, y cada 10 tubos, utilizando una muestra estándar de espermatozoides ovinos. La mediana de los voltajes de estos fotodetectores fue 565 y 740, respectivamente. El voltaje del fotodetector FL2 se fijó en 527.
- 10 Se adquirieron entre 1 779 y 10 667 eventos (correspondientes a partículas), dependiendo de las condiciones de cada muestra. Los datos se guardaron en formato FCS v. 2. El análisis se realizó con el paquete estadístico R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), utilizando las bibliotecas nlme (Nonlinear Mixed-Effects Models), flowCore (S4 data structures and basic infrastructure and functions to deal with flow cytometry data) y flowClust (Robust Model-based Clustering
- 15 for Flow Cytometry). Para cada evento, se definió automáticamente el índice DFI, así como el ratio entre las intensidades de las fluorescencias naranja y verde. Las intensidades de las fluorescencias naranja y verde se utilizaron como entrada en un análisis de agrupamiento no supervisado (*clustering*), utilizando funciones específicas para tratar datos de citometría de flujo. La población correspondiente al *debris* que no se pudo eliminar mediante *gating*
- 20 (Figura 1, panel superior) fue detectada y eliminada automáticamente utilizando este procedimiento (Figura 3A). Se detectaron y eliminaron  $1\,510 \pm 1\,197$  eventos (media  $\pm$  SD; rango: 0–5 779). Los valores de los parámetros obtenidos tras procesar los datos (fluorescencia verde y DFI) se muestran en las tablas 1 y 2 (media del DFI de todos los eventos, desviación estándar [SD] del DFI de todos los eventos, proporción de eventos con un DFI superior a un punto de corte definido por una muestra estándar [%DFI] y proporción
- 25 de eventos con intensidad de la fluorescencia verde por encima del canal 700 [%HDS]). La Tabla 1 muestra los valores obtenidos sin eliminar el *debris*, mientras que la Tabla 2 muestra los valores obtenidos tras realizar el procesamiento automático de los datos para eliminar el *debris*. La presencia de la población de *debris* causó un incremento considerable en los
- 30 valores de la muestra control y la muestra con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ . Los datos de la muestra sometida a 1 mM de  $\text{Fe}^{2+}$  no se vieron tan afectados, debido a que en estas muestras la población espermática solapó en sus valores de fluorescencia roja y verde con la población de *debris*.
- 35 Al analizar estadísticamente los datos obtenidos (utilizando modelos lineales de efectos mixtos), quedó patente que la presencia de *debris* alteraría una correcta interpretación de los resultados. Se encontraron diferencias apreciables en cuanto a la significación de los



distintos efectos para SD DFI y %DFI (Tabla 3), con cambios menores para el parámetro media DFI. %HDS fue el parámetro menos afectado por la presencia de *debris*.

Tabla 1

5

Tiempo (h)	Tratamiento	media DFI	SD DFI	%DFI	%HDS
0	Control	20±0,2	6,1±1,3	17,4±3,8	6,8±0,2
3	Control	30,3±1,3	4,9±0,1	59,7±5,1	19,5±0,8
3	Fe <sup>2+</sup> 10 µM	31,5±2,3	7,4±0,6	51,7±3,9	16,6±3,7
3	Fe <sup>2+</sup> 1 mM	32,7±0,2	5,1±0,1	77±1,3	13,5±1,5
6	Control	29,4±0,4	7,5±1,2	36,1±0,9	8,3±1,8
6	Fe <sup>2+</sup> 10 µM	30,4±0,4	8,8±0,9	34,6±4,1	8,2±1,9
6	Fe <sup>2+</sup> 1 mM	35,9±1,9	8,5±1,8	80±1,7	2±1,4

Valores medios±desviación estándar de los datos de los parámetros derivados del análisis de la cromatina espermática según Evenson (Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). Methods Mol. Biol., 2013, 927, 147–164), para cada tratamiento del Ejemplo 1, en el caso de no haber eliminado los eventos no espermáticos previamente.

10

Tabla 2

Tiempo (h)	Tratamiento	media DFI	SD DFI	%DFI	%HDS
0	Control	17,3±1	2,3±0,8	0,1±0,1	6,7±0,7
3	Control	26,3±2,2	3,4±0,5	20±17,5	29±0,2
3	Fe <sup>2+</sup> 10 µM	26,1±2,1	3,9±0,1	17,4±10,1	22,2±3,5
3	Fe <sup>2+</sup> 1 mM	31,9±1,5	5,5±0,5	68,6±13,2	15,2±4,1
6	Control	24,9±0,5	3,1±0	9,1±1,6	8,7±2,9
6	Fe <sup>2+</sup> 10 µM	25,6±1	3,5±0,3	11,7±5,1	8,7±3
6	Fe <sup>2+</sup> 1 mM	35,7±2	8,8±1,2	77,2±3,9	1,9±1,3

Valores medios±desviación estándar de los datos de los parámetros derivados del análisis de la cromatina espermática según Evenson (2013), para cada tratamiento del Ejemplo 1, en el caso de que los eventos no espermáticos hayan sido eliminados previamente.

15

Tabla 3

20

ES 2 428 963 B2

Datos sin procesar

media DFI	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7	1900,7332	<0,0001
tiempo	1	7	21,4276	0,0024
tratamiento	2	7	5,9675	0,0307
tiempo:tratamiento	2	7	2,0613	0,1977

SD DFI	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7	440,3511	<0,0001
tiempo	1	7	8,828	0,0208
tratamiento	2	7	1,4408	0,2992
tiempo:tratamiento	2	7	1,947	0,2127

%DFI	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7	189,90494	<0,0001
tiempo	1	7	3,00519	0,1266
tratamiento	2	7	10,06137	0,0087
tiempo:tratamiento	2	7	1,4667	0,2938

%HDS	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7	59,46308	0,0001
tiempo	1	7	2,00393	0,1998
tratamiento	2	7	0,80758	0,4835
tiempo:tratamiento	2	7	2,88679	0,1218

Datos procesados

media DFI	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7	678,2753	<0,0001
tiempo	1	7	24,2769	0,0017
tratamiento	2	7	19,2576	0,0014
tiempo:tratamiento	2	7	1,3752	0,3135

SD DFI	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7	656,7387	<0,0001
tiempo	1	7	27,9516	0,0011

tratamiento	2	7	45,5815	0,0001
tiempo:tratamiento	2	7	10,0588	0,0087
%DFI	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7	31,66912	0,0008
tiempo	1	7	11,32812	0,012
tratamiento	2	7	61,71591	<0,0001
tiempo:tratamiento	2	7	0,71259	0,5228
%HDS	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	7	29,676917	0,001
tiempo	1	7	1,359533	0,2818
tratamiento	2	7	0,594127	0,5777
tiempo:tratamiento	2	7	1,681755	0,2533

Resultados de un análisis de la varianza (ANOVA) de los modelos obtenidos tras el análisis de los datos del Ejemplo 1, utilizando modelos lineales de efectos mixtos.

- 5 **Ejemplo 2.** Análisis de la estructura de la cromatina espermática por el procedimiento de la invención en muestras de semen porcino.

Se realizó un estudio comparativo de muestras procedentes de 7 verracos (razas Landrace y Large white). Las muestras consistieron en dosis de verraco a  $10^9$  células/mL, producidas a partir de machos seleccionados mantenidos en el centro de selección porcino CENTROTEC (León, España). Las muestras (1 a 3 eyaculados por macho) se obtuvieron mediante el método de “mano enguantada”. Las muestras se procesaron y congelaron según Eriksson y Rodríguez-Martínez (2000), con la salvedad de que el diluyente para el primer paso fue MR-A (Kubus S.A., Madrid, España). Las dosis seminales (pajuelas de 0,25 mL) se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su descongelación, en la que se utilizó un baño de agua a 50 °C y un tiempo de descongelación de 12 s. A los 10 min tras la descongelación, se transfirieron 400 000 espermatozoides a 200 µL de medio TNE (Tris-NaCl-EDTA) en criotubos, congelándose inmediatamente mediante inmersión en nitrógeno líquido. Los criotubos se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. El análisis mediante citometría de flujo se realizó de manera idéntica a la descrita en el Ejemplo 1, salvo que para ajustar los fotodetectores se utilizó un estándar de espermatozoides de cerdo. Para cada macho y congelación se descongelaron 3 pajuelas, que se analizaron independientemente.

Se adquirieron entre 4 185 y 9 227 eventos por muestra. Los datos se guardaron en formato FCS v. 2. El análisis se realizó con el paquete estadístico R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), utilizando las bibliotecas nlme (Nonlinear Mixed-Effects Models), IDPmisc (Utilities of Institute of Data Analyses and Process Design) y flowCore (S4 data structures and basic infrastructure and functions to deal with flow cytometry data). Para cada evento, se definió automáticamente el índice DFI, así como el ratio entre las intensidades de las fluorescencias naranja y verde. Para identificar el *debris*, se aplicó un algoritmo de detección de picos a los datos de densidad del ratio naranja/verde (calculado mediante una estimación de densidad de kernel). El pico correspondiente al *debris* (Figura 3B) fue detectado, eliminando automáticamente la población de eventos correspondiente. Se detectaron y eliminaron 1 333±1 986 eventos (media±SD; rango: 0–6454) mediante este método. La Tabla 4 muestra el número de eventos identificados como *debris* y eliminados para cada macho, observándose la variabilidad entre machos y dentro de cada macho. La presentación de los resultados se realiza de igual manera que en el Ejemplo 1. En las tablas 5 y 6 se muestran los valores de los parámetros obtenidos tras procesar los datos, antes de eliminar el *debris* (Tabla 4) y después de eliminarlo (Tabla 5). La presencia del *debris* incrementó significativamente los valores de todos los parámetros, excepto en el caso del %HDS.

La presencia de *debris* causaría una alteración considerable en la interpretación de los datos. La Tabla 7 muestra los resultados de un análisis del efecto del macho utilizando modelos lineales de efectos mixtos. Mientras que el análisis de las muestras sin *debris* indica que el efecto macho no presenta efectos significativos, el análisis de los datos no procesados (con *debris*) muestra un efecto significativo del factor macho en todos los parámetros excepto %HDS, debido al incremento de sus valores en aquellos machos que presentaron mucho *debris* en el análisis por citometría de flujo (Tabla 4).

Tabla 4

Macho	<i>debris</i>
A	2487±2113
B	0±0
C	2263±2386
D	76±131
E	16±32
F	3879±1315

G

0±0

Valores medios±desviación estándar del número de eventos identificados como *debris* en muestras espermáticas de 7 verracos (1–3 congelaciones por macho y dosis analizadas por triplicado).

5

Tabla 5

Macho	media DFI	SD DFI	%DFI	%HDS
A	32,9±11,2	9,4±4,1	45,7±39	2,6±0,9
B	19,2±2,1	2,9±0,4	0,9±1	0,5±0,1
C	30,9±11,3	8,2±3,5	39,6±37,1	2,9±1,8
D	21±1,5	5,3±2,4	2,1±1,1	6±2,5
E	23±2,8	4,3±0,9	7,7±15,9	5,7±5,2
F	37,8±8,3	11,6±3,2	69,3±16,7	4,2±2,8
G	21,6±0,8	6,1±2	1,8±0,8	4,4±2,1

10

Valores medios±desviación estándar de los datos de los parámetros derivados del análisis de la cromatina espermática según Evenson (2013), para cada tratamiento del Ejemplo 2, en el caso de no eliminar los eventos no espermáticos previamente.

Tabla 6

Macho	media DFI	SD DFI	%DFI	%HDS
A	25,7±5,5	4,5±2,1	28,2±35,5	3,9±1,9
B	19,2±2,1	2,7±0,5	0,9±1	0,5±0,1
C	24,8±5,4	3,4±2,2	25,5±34,9	4,2±2,8
D	20,7±1,4	3,3±1,6	1,4±0,7	6,1±2,6
E	22,9±2,8	3,7±1,2	7,6±16,1	5,7±5,2
F	26,9±3,6	5,3±1,1	41±23,8	6,6±2,9
G	21,6±0,8	6±2	1,8±0,8	4,4±2,1

15

Valores medios±desviación estándar de los datos de los parámetros derivados del análisis de la cromatina espermática según Evenson (2013), para cada tratamiento del Ejemplo 2, en el caso de que los eventos no espermáticos hayan sido eliminados previamente.

Tabla 7

Datos sin procesar

<u>media DFI</u>	<u>numDF</u>	<u>denDF</u>	<u>F-value</u>	<u>p-value</u>
(Intercept)	1	32	419,9403	<,0001
macho	6	11	3,8323	0,026

<u>SD DFI</u>	<u>numDF</u>	<u>denDF</u>	<u>F-value</u>	<u>p-value</u>
(Intercept)	1	32	191,22195	<,0001
macho	6	11	4,27918	0,0181

<u>%DFI</u>	<u>numDF</u>	<u>denDF</u>	<u>F-value</u>	<u>p-value</u>
(Intercept)	1	32	36,65589	<,0001
macho	6	11	5,48138	0,0075

<u>%HDS</u>	<u>numDF</u>	<u>denDF</u>	<u>F-value</u>	<u>p-value</u>
(Intercept)	1	32	70,48137	<,0001
macho	6	11	1,55088	0,2498

Datos procesados

<u>media DFI</u>	<u>numDF</u>	<u>denDF</u>	<u>F-value</u>	<u>p-value</u>
(Intercept)	1	32	1094,1840	<,0001
macho	6	11	1,8406	0,1802

<u>SD DFI</u>	<u>numDF</u>	<u>denDF</u>	<u>F-value</u>	<u>p-value</u>
(Intercept)	1	32	206,10947	<,0001
macho	6	11	2,04126	0,1445

<u>%DFI</u>	<u>numDF</u>	<u>denDF</u>	<u>F-value</u>	<u>p-value</u>
(Intercept)	1	32	15,429419	0,0004
macho	6	11	1,980333	0,1544

<u>%HDS</u>	<u>numDF</u>	<u>denDF</u>	<u>F-value</u>	<u>p-value</u>
(Intercept)	1	32	105,33923	<,0001
macho	6	11	1,33301	0,3211

Resultados de un análisis de la varianza (ANOVA) de los modelos obtenidos tras el análisis de los datos del Ejemplo 2, utilizando modelos lineales de efectos mixtos.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para eliminar partículas no espermáticas en una muestra de semen obtenida de un animal en el que se realiza un análisis de la estructura de la cromatina espermática por citometría de flujo, donde dicho análisis comprende la desnaturalización  
5      ácida del ADN y posterior tinción con naranja de acridina del ADN, caracterizado por que comprende:
  - (a) excitar dicha muestra con un láser que emite luz de longitud de onda entre 400 y 535 nm,
  - 10     (b) detectar la fluorescencia verde y naranja emitida por la muestra con dos fotodetectores,
  - (c) utilizar los valores de fluorescencia verde y naranja para discriminar partículas espermáticas de partículas no espermáticas y eliminar las partículas no espermáticas del análisis.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho animal es un  
15      mamífero.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que dicho mamífero está seleccionado del grupo compuesto por oveja, cerdo, cabra, vaca, caballo y humano.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que en la etapa (b) dicha fluorescencia naranja se detecta con un fotodetector que recoge la  
20      fluorescencia emitida entre 550 y 620 nm.
5. Procedimiento según cualquiera de reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que en la etapa (c) se utiliza la relación entre el valor de la fluorescencia naranja y la fluorescencia verde o la relación entre el valor de la fluorescencia naranja y la suma de los valores de fluorescencia naranja y fluorescencia verde.



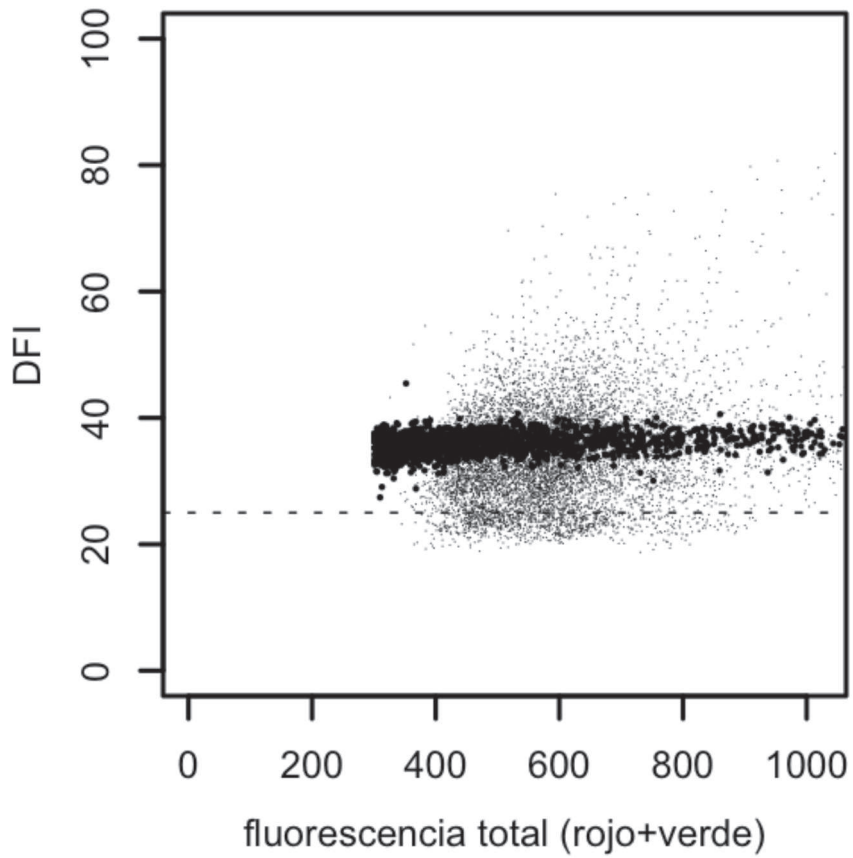
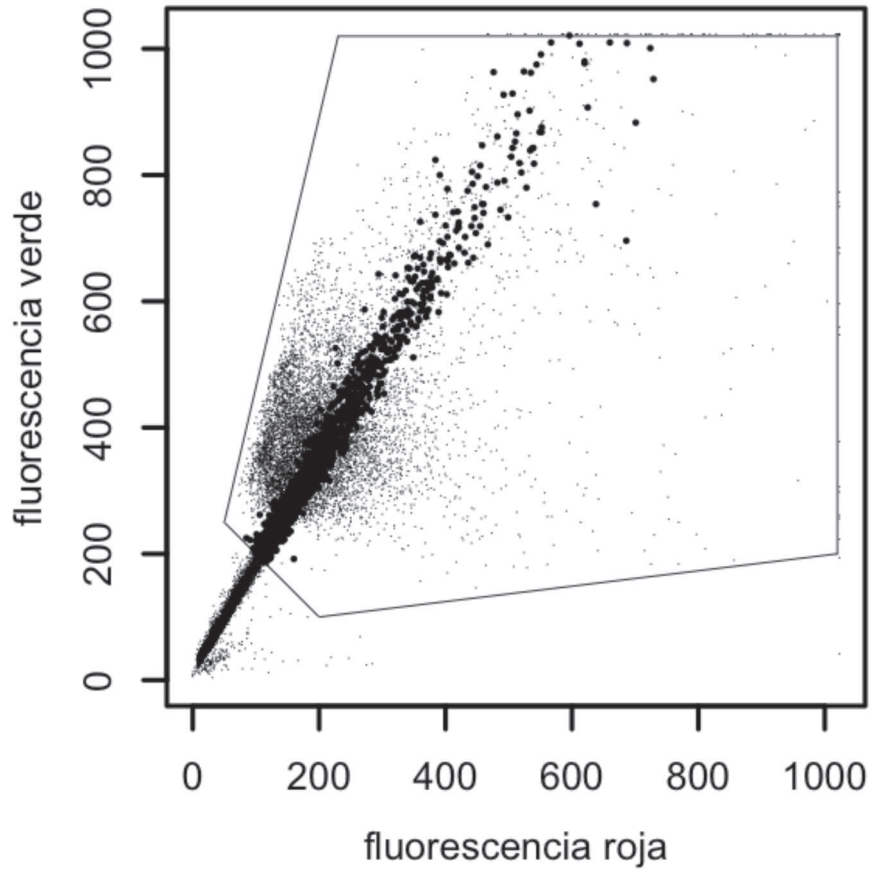


Fig. 1

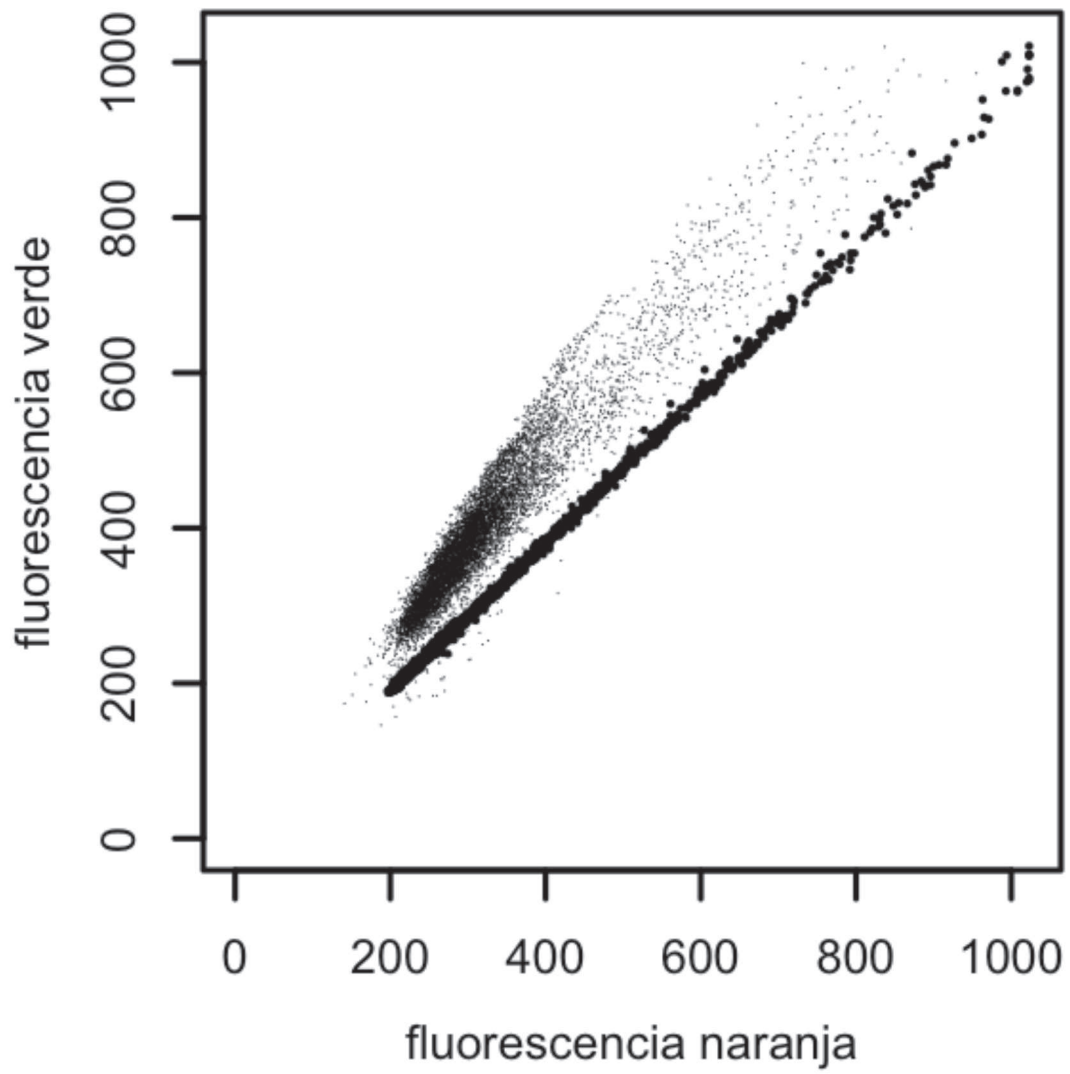
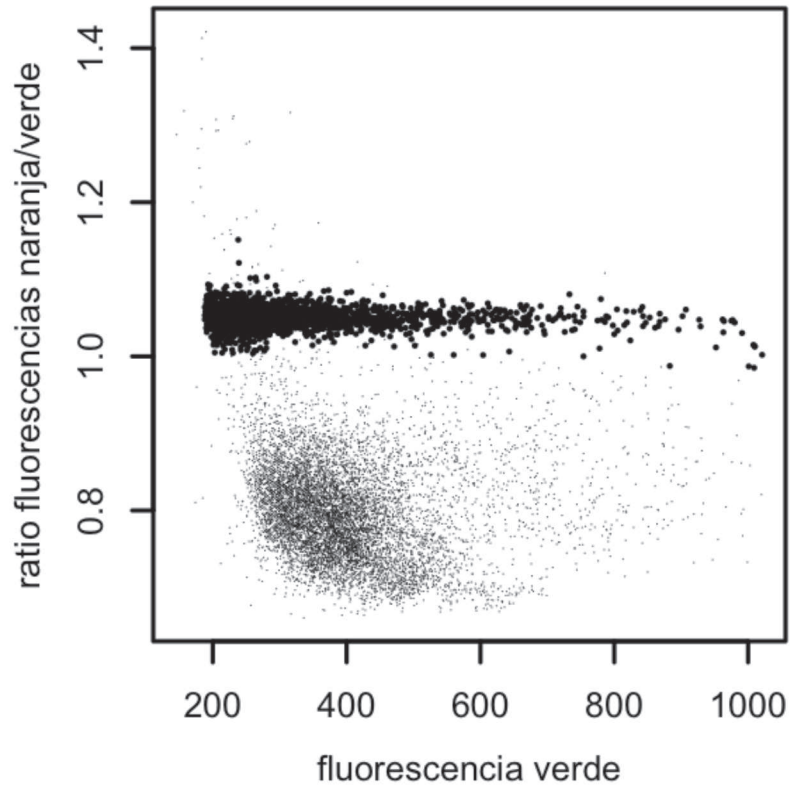


Fig. 2

**A**



**B**

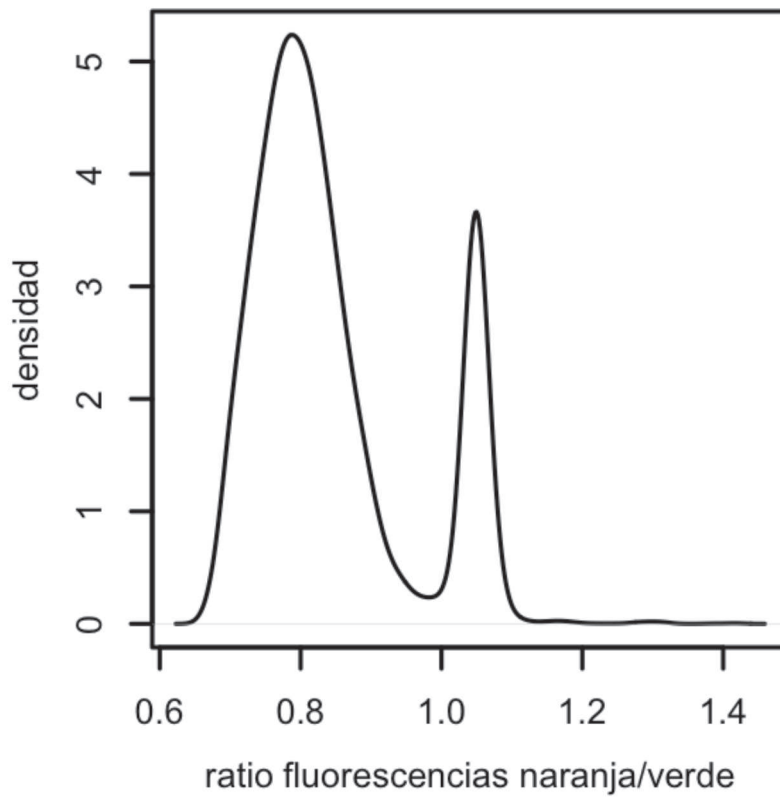


Fig. 3



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201330984

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 02.07.2013

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **G01N33/52** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EVENSON D.P., et al. "Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic" HUMAN REPRODUCTION (1999) Vol. 14, N.º. 4, páginas 1039-1049; DOI: 10.1093/humrep/14.4.1039, todo el documento.	1-5
A	WO 2008099385 A2 (DYN BIOSHAF 2006 LTD et al.) 21.08.2008, todo el documento.	1-5
A	US 2008138824 A1 (SHAI SHAFRIRA) 12.06.2008, todo el documento.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
28.10.2013

Examinador  
M. Á. García Coca

Página  
1/4

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

G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, NPL, MEDLINE/NLM, XPESP/ELSEVIER, bases de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.10.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-5	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-5	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EVENSON D.P., et al. "Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic" HUMAN REPRODUCTION (1999) Vol. 14, N°. 4, páginas 1039-1049; DOI: 10.1093/humrep/14.4.1039.	1999
D02	WO 2008099385 A2 (DYN BIOSHAF 2006 LTD et al.)	21.08.2008
D03	US 2008138824 A1 (SHAI SHAFRIRA)	12.06.2008

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-5, es un procedimiento para eliminar partículas no espermáticas en una muestra de semen, mediante un análisis de la estructura de la cromatina espermática por citometría de flujo. El procedimiento se basa en la tinción del ADN con naranja de acridina y la detección posterior de fluorescencia verde y naranja. La relación de los valores de fluorescencia obtenidos se utiliza para discriminar partículas espermáticas de las no espermáticas.

**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga la idoneidad del análisis de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) como herramienta, en clínica, para el diagnóstico y pronóstico de la fertilidad humana. En este documento se divulga que mediante SCSA se mide la susceptibilidad del DNA de los espermatozoides a la desnaturalización in situ, seguido de una tinción con naranja de acridina. De esta forma, utilizando las propiedades metacromáticas del naranja de acridina, se puede distinguir mediante un citómetro de flujo, el DNA desnaturalizado (emite fluorescencia roja) y el DNA nativo (emite fluorescencia verde). En este documento también se divulgan métodos basados en SCSA, en los cuales, en algunas ocasiones, el núcleo de los espermatozoides emite fluorescencia amarilla, entre verde y roja.

El documento D02 divulga un método basado en la citometría de flujo para evaluar la calidad del esperma en una muestra, así como para la extracción o recolección del esperma de mejor calidad de la muestra para su uso en fertilización, basados en la condensación del DNA en el esperma. El método se basa en la utilización de naranja de acridina y la posterior detección de fluorescencia verde y roja. En este documento se divulga el uso de distintos citómetros de flujo comerciales, que presentan un laser de excitación azul que opera a 488nm, un fotomultiplicador FL1 para la detección de fluorescencia verde (530 nm), un fotomultiplicador FL2 para la detección de fluorescencia naranja (585 nm) y un fotomultiplicador FL2 para la detección de fluorescencia roja (650 nm).

El documento D03 divulga métodos para cuantificar el número absoluto de células espermáticas maduras en una muestra, útil para la evaluación rutinaria de la calidad del semen para inseminación artificial (determinando el grado de dilución requerido para que en cada inseminación haya el número adecuado de células). Uno de los métodos divulgados se basa en la utilización de naranja de acridina y la posterior detección de fluorescencia verde y roja mediante la utilización de citómetros de flujo comerciales, que presentan un laser de excitación azul que opera a 488nm, un fotomultiplicador FL1 para la detección de fluorescencia verde (530 nm), un fotomultiplicador FL2 para la detección de fluorescencia naranja (585 nm) y un fotomultiplicador FL2 para la detección de fluorescencia roja (650 nm).

Aunque en el estado de la técnica ya es conocido el análisis de la cromatina espermática por citometría de flujo (ver documento D01) y que existen en el mercado citómetros de flujo que miden no sólo la fluorescencia verde y roja, sino también la naranja (ver documentos D02 y D03), en este tipo de análisis sólo se miden las fluorescencias verde y roja.

A la vista del estado de la técnica, ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-5. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por dichas reivindicaciones.

Por lo tanto, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-5 es, con referencia a los documentos D01-D03, nueva y se considera que implica actividad en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley 11/1986 de patentes.