



oxisperm®

Kit REF HT-OS20
para 20 determinaciones

	consultar instrucciones de uso
	referencia del producto
	número de lote
	fecha de caducidad
	fabricante
	contiene cantidad suficiente para "h" ensayos
	limitación de temperatura
	mantener seco

Fundamento de la técnica

El estrés oxidativo se produce cuando las defensas antioxidantes naturales son incapaces de neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan durante el metabolismo celular.

El resultado final es que se produce daño celular a diferentes niveles. Tanto las células somáticas como las de la línea germinal pueden ser dianas de las ROS. Cuando afecta a las células germinales, el estrés oxidativo tiene un impacto directo en la fertilidad masculina.(Aitken and De Iuliis, 2010).

Actualmente, existen varios test para la determinación de los niveles de ROS y de las diferentes moléculas causantes del estrés oxidativo. Sin embargo, estos test no se usan de forma rutinaria en los laboratorios de andrología. Oxisperm proporciona al clínico un ensayo sencillo y fiable para medir el exceso de aniones superóxido (O_2^-) y de otras moléculas causantes de estrés oxidativo.

Este test está basado en el ensayo de azul de nitro-tetrazolio (NBT), en forma de gel reactivo (RB) en el kit de Oxisperm. El ensayo NBT se basa en la capacidad de la sal de tetrazolio, soluble en agua, de convertirse en una forma cristalina de color azul denominada formazán por la acción de los aniones superóxido(Baehner et al., 1976).

En el esperma, los productos de esta reacción se adhieren a las membranas de los espermatozoides y pueden visualizarse por microscopía de campo claro. (Imagen 1). Estos cristales producen un aumento de la intensidad del color en el RG (de amarillo hasta diferentes niveles de morado-azulado, como se ve en el diagrama), que puede cuantificarse con facilidad y de una manera comparativa utilizando una escala de color.

De forma alternativa, se puede usar un colorímetro para medir la absorbancia de las longitudes de onda, que van desde los 530 nm hasta los 630 nm. La intensidad del color está estrechamente relacionada con el nivel de estrés oxidativo (un exceso aniones superóxido) de la muestra (ver la paleta de color).

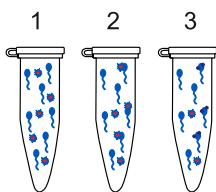


Imagen 1. Una representación esquemática de la reacción oxidativa y cómo el esperma se transforma después de la conversión de NBT, a formazán. La imagen de la derecha muestra espermatozoides afectados por el O_2^- y otros en los que el efecto es nulo. A medida que el número de moléculas depositadas en la superficie del esperma aumenta, la intensidad del color del RG también lo hace.

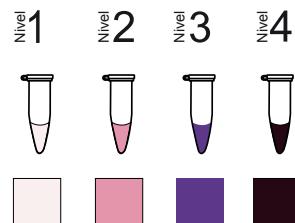


Imagen 2.- Representación esquemática del nivel de intensidad de color según la capacidad de la muestra de esperma de producir una reacción colorimétrica.

Protocolo

1. Colocar el tubo con el gel reactivo, usando el flotador en el vaso de precipitados y calentar durante un minuto en un microondas a máxima potencia. Otra opción sería licuar el gel reactivo en un baño de agua a 90° durante aproximadamente 5 minutos.
2. Reducir la temperatura del reactivo a 37°C usando un baño de agua o un horno a 37° C.
3. Mezclar el gel reactivo con la muestra de semen en uno de los tubos eppendorf que se incluyen en el kit. Tratar de evitar burbujas en la mezcla resultante.
4. Incubar durante 45 minutos a 37°C y comparar el color de la muestra con el color del esquema.

Han sido pre-clasificados cuatro niveles de intensidades : N1: bajo; N2: medio-bajo; N3: medio N4: alto.

Cómo calcular la muestra necesaria

Dividir 1000 entre la concentración de esperma. El resultado obtenido es el volumen que tiene que mezclarse con un volumen idéntico de gel reactivo. (Proporción 1:1 ; Semen-Gel reactivo)

Ejemplo: para una concentración de 32 millones de espermatozoides:

$$1000 / 32 = 31.25$$

$$31.25 \mu\text{l de semen} + 31.25 \mu\text{l de GR}.$$

Para hacer estos cálculos más sencillos se pueden multiplicar los volúmenes por un factor común hasta un máximo de 100 μl para ambas partes de la mezcla.

En nuestro ejemplo ésto debería ser:

$$31.25 \times 3 = 93.75 \mu\text{l de semen} + \text{la misma cantidad (93.75 } \mu\text{l) de GR.}$$

En este caso, se ha usado un factor x3.

Para obtener los mejores resultados, el test debería de hacerse usando muestras frescas de semen y justo después de la eyaculación. El análisis del estrés oxidativo en las muestras debe realizarse 60 minutos después de la eyaculación. Si se hiciese a tiempos más prolongados se podrían obtener falsos resultados. Se debe mantener una temperatura cercana a los 37°C mientras se mezcla la muestra de semen con el gel reactivo, en caso contrario, la mezcla se gelificará.

Nota: Es muy importante ser muy precisos a la hora de calcular la concentración del esperma. Concentraciones elevadas de esperma pueden producir intensidades de color elevadas debido a la aceleración del estrés oxidativo por colisión de los espermatozoides seguida de daño en la membrana



Precauciones

1. Todas las muestras de pacientes deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y el usuario deberá llevar guantes protectores, protección en los ojos y ropa de laboratorio mientras esté realizando el test.
2. Todo el material utilizado para realizar la prueba se debe desechar en un recipiente adecuado para riesgo biológico después de la prueba.
3. No comer, beber ni fumar en el área donde se manipulan las muestras y los reactivos de ensayo.
4. Se recomienda el uso de guantes y máscara facial.

Condiciones de almacenamiento

Almacenar a una temperatura de 2-8°C

Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 2010;16:3-13.

Baehner, R. L., Boxer, L. A. & Davis, J. (1976) The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 48, 309-313.