

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 963**

51 Int. Cl.:
A01N 1/02 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
A61K 35/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08872688 .0**
96 Fecha de presentación: **24.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2247181**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.11.2010**

54 Título: **Procedimientos para la conservación del esperma y sus aplicaciones**

30 Prioridad:
27.12.2007 FR 0709145

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.03.2012

73 Titular/es:
**Institut National De La Recherche Agronomique
Etablissement Public à Caractère Scientifique
147, rue de l'Université
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:
**MAGISTRINI, Michèle;
PILLET, Elodie;
BATELLIER, Florence y
DUCHAMP, Guy**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

ES 2 376 963 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

Procedimientos para la conservación del esperma y sus aplicaciones

5 La presente invención se refiere a la conservación del esperma, y más en particular a la preservación de la capacidad de fecundación de los espermatozoides debilitados por un proceso de congelación u otro tratamiento.

10 Con el desarrollo de la biotecnología reproductiva, las técnicas de inseminación artificial son una práctica habitual en numerosas especies animales, principalmente en cabras, ovejas, cerdos, bovinos y equinos. No obstante, los espermatozoides son células complejas altamente especializadas que pueden perder rápidamente su capacidad de fecundación. Por lo tanto, la conservación a largo plazo en estado refrigerado (temperaturas positivas) o en estado congelado del esperma mientras se mantiene su capacidad de fecundación supone un problema.

15 Además, con el fin de permitir una conservación óptima del esperma hasta su utilización para la inseminación artificial, normalmente se utiliza un medio en el que el esperma se diluye inmediatamente después de su obtención. La mezcla esperma/medio de dilución se divide en alícuotas que contienen un número de espermatozoides suficientes para fecundar el óvulo, por ejemplo un mínimo de 2×10^8 espermatozoides en caballos para la inseminación artificial de semen "fresco". Según el medio de dilución utilizado y la temperatura a la que se conserva la mezcla de esperma/medio, la vida útil en general varía entre algunas horas a varios días, o un periodo más prolongado en el caso de que el medio permita su congelación. El esperma conservado entre 4 °C y 20 °C presenta la desventaja de que debe ser utilizado en las horas o 2-3 días siguientes a su obtención. Por el contrario, la conservación del esperma por congelación permite conservar el semen de un macho durante varios años. Asimismo la congelación del esperma permite conservar el patrimonio genético de un macho de alto valor genético y que se pueda evaluar después de su muerte o su castración. La congelación del esperma permite además el transporte del semen a criaderos geográficamente distantes del lugar de recogida, lo que facilita el intercambio y difusión del acervo genético o la venta internacional de semen.

30 No obstante, se ha demostrado que el proceso de congelación/descongelación disminuye el porcentaje de espermatozoides intactos (Watson. P.F., Anim. Reprod. Sci. 60-61: 481-492, 2000): la congelación presenta el inconveniente de provocar la degradación de funciones fisiológicas importantes de los espermatozoides que reducen parcial o completamente su capacidad de fecundación. Dado que la calidad del semen es primordial en la inseminación artificial, una dosis de inseminación que contenga un número importante de espermatozoides muertos o debilitados presentará una capacidad de fecundación reducida, limitando así la fertilidad del macho después de la inseminación.

35 Por tanto, la puesta a punto de un medio de dilución que permita mejorar la conservación del semen y preservar una buena capacidad de fecundación de los espermatozoides después de su congelación es objeto de numerosas investigaciones.

40 En sementales, el medio que ha permitido las primeras fecundaciones después de inseminación artificial de semen congelado estaba constituido por leche entera pasteurizada que contenía un 10% de glicerol (Barker y col. Canadian Journal of Comparative Medical Veterinary Science, 21:47-51, 1957).

45 Entre los medios de dilución más frecuentemente utilizados para la congelación del semen de un semental, citaremos en particular los medios descritos por Martin y col. (J. Reprod. Fertil., Suppl. 27:47-51, 1979), Burns P.J. (Proc. 12th International Congress on Animal Reproduction The Hague 1992; 4:1849-1851), y el medio denominado "INRA82", descrito por Palmer E. (Proc. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Urbana-Champaign, IL, USA, 3:377, 1984), modificado por Magistrini y col. (Acta Veterinaria Scandinavica, 1st European Symposium on Production, Evaluation and Preservation of Stallion Semen, 1-2 de octubre de 1992, Uppsala, Suecia, Suppl. 88, 97-110) y que consiste en un medio base suplementado con leche desnatada UHT.

50 En general, estos medios de congelación se suplementan con diversas sustancias, con el fin de mejorar la protección de los espermatozoides. Vidament y col. (Theriogenology., 54, 907-19, 2000) han evolucionado la técnica descrita por Palmer E. (1984): el esperma se diluye en el medio INRA82 suplementado con yema de huevo y se centrifuga, y los sedimentos de la centrifugación se recogen en el mismo medio suplementado adicionalmente con glicerol, antes de la congelación. Los mejores resultados se obtienen llevando a cabo la centrifugación y la adición de glicerol a una temperatura de 22°C, y a continuación una refrigeración gradual hasta 4 °C antes de la formación de pajillas y de la congelación; en estas condiciones, se observa, no sólo una mejora de la movilidad de los espermatozoides después de la descongelación, sino también una mejora de la fertilidad.

60 Sin embargo, incluso en estas condiciones optimizadas, la capacidad de fecundación de los espermatozoides después de la descongelación aún es inferior a la del semen fresco. Un estudio realizado en Francia en el periodo comprendido entre 1985-2005 en la Yeguada Nacional de Francia informa de que las tasas de gestación obtenidas después de inseminación artificial con el semen de sementales congelado en el medio INRA82 anteriormente mencionado suplementado con yema de huevo y glicerol en las condiciones indicadas anteriormente, y utilizando

semen cuya movilidad después de la descongelación es superior al 35%, fue del 45-48% (Vidament. M., Anim. Reprod. Sci. 89:115-136, 2005) en comparación con el 55% para el semen fresco.

Además de los medios de dilución del esperma destinados a la congelación, también existen otros destinados a la conservación de los espermatozoides a temperaturas positivas. Así, la Solicitud PCT WO9837904 describe un medio de dilución del esperma constituido por un medio base que contiene, en lugar de leche, fosfocaseinato nativo, y/o β -lactoglobulina. A una temperatura de 4°C, el medio de dilución que contiene fosfocaseinato nativo presenta, *in vitro*, un rendimiento similar e incluso a veces inferior al del medio INRA82 constituido por un medio base suplementado con leche desnatada UHT; sin embargo, mejora de manera muy significativa la conservación del esperma a 15°C.

Los inventores han sometido a pruebas los efectos del medio de dilución del esperma, como se describe en la Solicitud PCT WO9837904, suplementado con yema de huevo y glicerol, sobre la conservación de los espermatozoides durante la congelación. Los primeros ensayos han demostrado que este medio no mejoraba los parámetros de movilidad de los espermatozoides después de la descongelación, en comparación con un medio base suplementado con leche (el INRA82 anteriormente mencionado), y yema de huevo y glicerol. Sin embargo, los inventores ahora han encontrado que, sorprendentemente, mejoraba de manera significativa la capacidad de fecundación de los espermatozoides.

Esta mejora en la capacidad de fecundación parece estar relacionada con la capacidad de este medio para preservar eficazmente la integridad de la membrana de los espermatozoides por el estrés resultante de la congelación/descongelación. Por tanto, se puede utilizar para mejorar la capacidad de fecundación de espermatozoides debilitados, no sólo por el proceso de congelación, sino por cualquier otro tipo de manipulación que pueda tener un efecto perjudicial sobre las membranas de los espermatozoides. Estos incluyen principalmente citometría de flujo, utilizada en algunas especies de animales de granja, para separar los espermatozoides Y de los espermatozoides X antes de la inseminación.

La presente invención tiene por objeto la utilización de un medio de dilución del esperma, que comprende:

- un medio base que comprende los componentes adecuados para la dilución del esperma de una especie dada;
- fosfocaseinato nativo;
- yema de huevo o plasma de yema de huevo;
- y
- glicerol;

para mejorar la capacidad de fecundación de espermatozoides debilitados o dañados por el proceso de congelación y/o por la clasificación de espermatozoides por citometría de flujo.

El medio base de la presente invención incluye una disolución de sales minerales e hidratos de carbono, y no incluye la leche. La yema de huevo está constituida por un fluido en el que se suspenden diversas partículas (ANTON, Recent Res. Devel. in Agricultural & Food Chem., 2, 839-864, 1998). Éste es el líquido denominado "plasma de yema de huevo". Estas dos fases se pueden separar fácilmente por centrifugación. Esta separación generalmente se lleva a cabo mediante la dilución de la yema de huevo (para reducir su viscosidad), en agua o en una disolución débilmente salina (normalmente una disolución de NaCl de una molaridad inferior a 0,3 M, preferentemente inferior a 0,2 M), y sometiendo la mezcla resultante a centrifugación en condiciones (por ejemplo, 10.000 g durante 30 minutos) que permitan separar el plasma, que forma el sobrenadante, de la fracción de los "gránulos", que sedimenta en el fondo. De manera ventajosa, si se desea, se puede llevar a cabo una segunda centrifugación para eliminar de forma más completa la fracción de los gránulos.

En general, el plasma de yema de huevo también se esterilizará, por ejemplo por radiación gamma.

Por "medio base que comprende los componentes adecuados para la dilución del esperma de una especie dada", se entiende cualquier medio que comprenda componentes químicamente definidos, utilizados habitualmente en los medios de dilución del esperma empleados para esa especie. En general, se trata de una disolución de sales minerales e hidratos de carbono a un pH adecuado. La naturaleza y las proporciones de estos componentes pueden variar según la especie. El medio base también puede incluir aditivos tales como antibióticos o antifúngicos.

Según la presente invención, el medio de dilución del esperma utilizado comprende:

- del 1 al 10%, y preferentemente del 1,5 al 5% de glicerol;
- del 0,5 al 12,5%, preferentemente del 0,5 al 5%, y más preferentemente del 1 al 2,5% en peso de materia seca de yema de huevo, o del 0,4 al 10%, preferentemente del 0,4 al 4%, y más preferentemente del 0,8 al 2% en peso de materia seca de plasma de yema de huevo;
- entre 1 y 100 g/l, preferentemente entre 10 y 50 g/l de fosfocaseinato nativo.

La yema de huevo está constituida en un 50% aproximadamente de materia seca, y el plasma de yema de huevo representa el 80% aproximadamente de la materia seca de la yema de huevo: por lo tanto, el 2% de yema de huevo

fresca supone aproximadamente el 1% en peso de materia seca de yema de huevo y aproximadamente un 0,8% en peso de materia seca de plasma de yema de huevo.

5 La presente invención se puede llevar a cabo en el ámbito de la inseminación artificial en mamíferos de diferentes especies, especialmente en cabras, ovejas, cerdos, bovinos y equinos, y de manera particularmente ventajosa en las especies bovina y equina, según las modalidades de inseminación artificial habituales para la especie en cuestión, que son muy conocidas por la persona experta en la materia.

10 La presente invención se comprenderá mejor con la ayuda de la siguiente descripción adicional, que se refiere a ejemplos no limitantes de su uso en caballos.

EJEMPLO 1 - MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

a) Medios de dilución del espermatozoide

15 Los dos medios de dilución del espermatozoide utilizados en las siguientes pruebas comparativas son los medios "INRA82" e "INRA96®". El medio "INRA82" es una mezcla de 0,5 litros de un medio base (solución salina-glucosa: glucosa 25 g·l⁻¹, lactosa 1,5 g·l⁻¹, rafinosa 1,5 g·l⁻¹, citrato sódico deshidratado 0,25 g·l⁻¹, citrato de potasio 0,41 g·l⁻¹, HEPES 4,76 g·l⁻¹) con 0,5 litros de leche, a pH 6,8. El medio "INRA96®" se describe en la Solicitud PCT WO9837904 y en la publicación de Batellier y col., 1997 Theriogenology, 48-3, 391-410): está constituido por un medio base (medio HGLL, que consiste en sales de Hank suplementadas con tampón HEPES, lactosa y glucosa) y 27 g/l de fosfocaseinato nativo.

25 Asimismo los dos medios contienen 50.000 UI·l⁻¹ de penicilina y 50 mg·l⁻¹ de gentamicina.

Los medios INRA82 e INRA96® también están suplementados con un 2% de yema de huevo centrifugada (600 x g durante 10 minutos para eliminar una posible contaminación por la clara, la chalaza, o trozos de cáscara) y un 2,5% de glicerol: estos medios se denominan a partir de ahora respectivamente INRA82+YH+G y INRA96®+YH+G.

30 A modo de comparación, también se probó el medio INRA96® suplementado sólo con un 2,5% de glicerol. Este medio se denomina en lo sucesivo INRA96®+G.

b) Obtención del espermatozoide y preparación

35 Para este estudio se utilizaron tres sementales adultos de Gales de fertilidad conocida. Están estabulados en la unidad experimental del Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA) de Nouzilly, Francia. Se trataron siete eyaculados por semental. Después de la obtención, el semen se filtró a través de una gasa con el fin de eliminar la fracción de "gel" procedente de las vesículas seminales. Inmediatamente después de la filtración, cada eyaculado se dividió en dos alícuotas, que se diluyen en los medios INRA82 o INRA96®, con una dilución mínima de 1 parte en volumen por 3 de medio. La mezcla se enfrió a 22 °C durante 10 minutos y a continuación se centrifugó a 600 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en medio INRA82+YH+G o en medio INRA96®+YH+G, según el tipo de medio utilizado para la primera etapa, con el fin de obtener una concentración final de 100 x 10⁶ espermatozoides por ml. Cada muestra se enfrió a 4 °C durante 75 minutos, se puso en pajillas de congelación de 0,5 ml en cloruro de polivinilo selladas por agentes de polimerización en polvo. La congelación se llevó a cabo con la ayuda de un congelador programable para bajar la temperatura de 4 °C a -140 °C a una velocidad de 60 °C por minuto. Las pajillas se almacenan en nitrógeno líquido a -196 °C, y se descongelan al baño María durante 30 segundos a 37 °C inmediatamente antes del análisis o de la inseminación artificial.

50 EJEMPLO 2 - EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CALIDAD DEL ESPERMA DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN

Se analizó la movilidad de los espermatozoides y la resistencia de su membrana plasmática a una serie de presiones hipo-osmóticas mediante análisis automatizado de la movilidad asistido por ordenador o por citometría de flujo, respectivamente.

a) Movilidad de los espermatozoides

60 Para evaluar la movilidad de los espermatozoides, se descongelaron tres pajillas de cada uno de los 7 eyaculados y para cada uno de 3 sementales y a continuación se diluyeron a una concentración de 20 x 10⁶ espermatozoides por ml en cada uno de los medios INRA82 o INRA96®. Antes del análisis, las muestras de espermatozoide diluido se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Los siguientes tres parámetros de movilidad de los espermatozoides son evaluados por un analizador de movilidad automático (IVOS, versión 10, Hamilton Thorne, Beverly, MA, EE.UU.): la velocidad media (VAP) en $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, el porcentaje de espermatozoides progresivos (PROG) y el porcentaje de espermatozoides rápidos (RAP: espermatozoides con una velocidad media superior a 30 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Los análisis se realizaron sobre 2 gotas por muestras y por pajilla y 3 campos ópticos por gota.

Comparación entre el medio INRA82+YH+G, y el medio INRA96@+YH+G.

La Figura 1 es un histograma que muestra los resultados obtenidos para los parámetros de movilidad VAP, PROG y RAP. Las barras blancas representan los resultados de cada uno de los tres parámetros evaluados después de congelar los espermatozoides en el medio INRA82+YH+G, y las barras de color gris oscuro representan los resultados de cada uno de los tres parámetros evaluados después de congelar los espermatozoides en el medio INRA96@+YH+G. Las barras de error representan la desviación estándar.

Estos resultados muestran que la velocidad media, el porcentaje de espermatozoides progresivos y el porcentaje de espermatozoides rápidos son significativamente superiores cuando el semen se congela en el medio INRA82+YH+G comparados con el medio INRA96@+YH+G (VAP: $82 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ frente a $66 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, $p < 0,0001$; PROG: 51% frente al 45%, $p < 0,0001$, RAP: 61% frente al 58%, $p < 0,01$). De este análisis se desprende que para la congelación en estas condiciones experimentales, el medio INRA82+YH+G conserva mejor la movilidad de los espermatozoides que el medio INRA96@+YH+G.

Comparación entre el medio INRA96+G, y el medio INRA96@+YH+G.

Para comparar los medios INRA96+G, e INRA96@+YH+G, se recogieron 10 eyaculados procedentes de 5 sementales, a razón de 2 eyaculados por semental, se congelaron, y se descongelaron, en las mismas condiciones que las descritas anteriormente.

La Figura 2 es un histograma que muestra los resultados obtenidos para los parámetros de movilidad VAP, PROG y RAP. Las barras blancas representan los resultados de los parámetros evaluados después de la congelación de los espermatozoides en el medio INRA96+G, y las barras negras representan los resultados de los parámetros evaluados después de la congelación de los espermatozoides en el medio INRA96@+YH+G. Las barras de error representan la desviación estándar.

Estos resultados muestran claramente que la velocidad media (VAP), el porcentaje de espermatozoides progresivos (PROG) y el porcentaje de espermatozoides rápidos (RAPID) son significativamente superiores cuando el semen se congela en el medio INRA96@+YH+G comparados con el medio INRA96+G (VAP: $63 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ frente a $42 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, $p < 0,001$; PROG: 45,5% frente al 20%, $p < 0,001$, RAP: 60% frente al 32%, $p < 0,001$). Estos resultados muestran que durante la congelación, el medio INRA96 se debe suplementar con glicerol y yema de huevo con el fin de preservar al máximo la movilidad de los espermatozoides.

b) Integridad de la membrana plasmática

La evaluación de la integridad de la membrana de los espermatozoides se lleva a cabo según el procedimiento descrito para la especie caprina por Leboeuf y col. (Animal Reproduction Science, 91,3-4: 265-274, 2006) y para la especie equina por Defoin y col. (Anim. Reprod. Sci. 89: 219-223, 2005). Este procedimiento consiste en probar la resistencia de la membrana de los espermatozoides sometidos a una tensión hipo-osmótica. El semen se descongela (dos pajillas por eyaculado y cinco eyaculados por semental) y se diluye en cada uno de los medios INRA82 o INRA96@ a una concentración de 20×10^6 espermatozoides por ml. Los espermatozoides diluidos se someten inmediatamente a centrifugación a 500 g durante 4 minutos, y el sedimento se resuspende en soluciones salinas de Hank (solución de sales de Hank), suplementadas con HEPES 20 mM, a una presión osmótica decreciente (303, 205, 154, 103, 63, 35, 12 mOsm), y a continuación se incuban durante 15 minutos a 37°C. Los espermatozoides se diluyen a 1×10^6 espermatozoides por ml, se marcan con yoduro de propidio (IP, concentración final $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y a continuación se incuban de nuevo durante 5 minutos a 37 °C antes de analizar la incorporación del IP por los espermatozoides mediante citometría de flujo (clasificador celular MoFlo®, Darko society, Dinamarca).

La Figura 3 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos en las pruebas de resistencia de la membrana de los espermatozoides. Las presiones de prueba están indicadas en el eje de abscisas: P0, P1, P2, P3, P4, P5 y P6 corresponden respectivamente a las presiones osmóticas 303, 205, 154, 103, 63, 35, 12 mOsm. El porcentaje de espermatozoides que han incorporado el IP se muestra en el eje de ordenadas. La curva blanca muestra los resultados obtenidos después de la congelación en el medio INRA82+YH+G, y la curva gris muestra los resultados obtenidos después de la congelación en el medio INRA96@+YH+G. Las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 3 muestra que cuando se produce una tensión osmótica hipotónica, independientemente de la presión osmótica a prueba (205, 154, 103, 63, 35, 12 mOsm), el porcentaje de espermatozoides que incorporan el IP, correspondiente al porcentaje de espermatozoides con la membrana dañada, es significativamente inferior ($p < 0,05$) cuando el semen se congela en el medio INRA96@+YH+G comparado con el medio INRA82+YH+G. Sin embargo, en el medio a 303 mOsm (iso-osmótico para los espermatozoides), la incorporación del IP es idéntica entre los espermatozoides congelados en el medio INRA82+YH+G y los congelados en el medio INRA96@+YH+G. Por otra parte, cualquiera que sea el medio utilizado, el porcentaje de espermatozoides que incorporan el IP (es decir, el porcentaje de espermatozoides con la membrana dañada) aumenta rápidamente en el medio hipo-osmótico a 205 mOsm en comparación con el medio a 303 mOsm. Por tanto, estos resultados indican que el medio

INRA96®+YH+G preserva mejor la integridad de las membranas de los espermatozoides durante la congelación.

EJEMPLO 3 - EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA CAPACIDAD DE FECUNDACIÓN DEL ESPERMA DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN

5 Las yeguas se sometieron a ecografías todos los días desde el primer día del ciclo menstrual hasta la ovulación. Cuando un folículo dominante alcanza un tamaño de 35 mm, la ovulación se induce mediante inyección intravenosa de 15 mg de CEG (gonadotropina pituitaria equina en bruto; Duchamp y col., Journal of Reproduction and Fertility, 35: 221-228, 1987) (Día 0), y las yeguas se inseminaron al día siguiente (día 1) con 400×10^6 espermatozoides previamente congelados en cualquiera de los medios INRA96®+YH+G o INRA82+YH+G (volumen de inseminación: 10 4 ml, u 8 pajillas descongeladas y reagrupadas). La distribución de las yeguas entre los dos grupos se realizó al azar. Los 7 eyaculados utilizados en la inseminación artificial presentan más del 35% de espermatozoides rápidos en el momento de la descongelación. Este valor es el mínimo requerido para que un eyaculado pueda ser utilizado en inseminación artificial en la Yeguada Nacional de Francia.

15 El diagnóstico de gestación se realizó por ecografía el día 14 después de la ovulación: la tasa de fertilidad por ciclo se calculó como número de ciclos que dan lugar a una gestación en comparación con el número total de ciclos de inseminación.

20 En total se utilizaron ochenta y cuatro ciclos de yeguas: 42 ciclos con espermatozoides previamente congelados en el medio INRA96®+YH+G, y 42 ciclos con espermatozoides previamente congelados en el medio INRA82+YH+G.

Los resultados se presentan en el histograma de la Figura 4. La fertilidad por ciclo está representada en la ordenada, y los medios de congelación INRA82+YH+G e INRA96®+YH+G se presentan en la abscisa.

25 Estos resultados muestran que la fertilidad por ciclo obtenida después de la inseminación artificial con espermatozoides congelados en el medio INRA96®+YH+G es del 71% (30 gestaciones para 42 inseminaciones), mientras que la obtenida con espermatozoides congelados en el medio INRA82+YH+G es sólo del 40% (17 gestaciones para 42 inseminaciones).

30 En conclusión, el medio INRA96® suplementado con el 2% de yema de huevo centrifugada y el 2,5% de glicerol mejoró significativamente ($p < 0,01$) la capacidad de fecundación de espermatozoides congelados en comparación con el medio control INRA82+YH+G.

EJEMPLO 4 - UTILIZACIÓN DE PLASMA DE YEMA DE HUEVO EN EL MEDIO INRA96+G EN SUSTITUCIÓN DE YEMA DE HUEVO ENTERA

El plasma de yema de huevo se prepara diluyendo volúmenes iguales de yema de huevo entera en NaCl 0,17 M, seguido por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 45 minutos. Se recuperó el sobrenadante de esta centrifugación y se volvió a centrifugar a $10.000 \times g$ durante 45 minutos. El sobrenadante de esta 2ª centrifugación es el plasma de yema de huevo que se utiliza para los siguientes experimentos. Antes de su utilización, el plasma se esterilizó por radiación gamma (a 5k Gy). Este plasma se utilizó al 4% en volumen (es decir, el 1% de materia seca aproximadamente), para suplementar el medio de dilución INRA96®.

45 El medio Infra96® suplementado con el 4% de plasma de yema de huevo y el 2,5% de glicerol se denomina INRA96®+plasmaYH+G.

Se llevaron a cabo pruebas comparativas con los medios INRA96®+plasmaYH+G e INRA96®+YH+G.

50 Los protocolos de obtención y preparación de las muestras de semen son idénticos a los descritos en el Ejemplo 1 más arriba.

a) Evaluación *in vitro* de la calidad del esperma después de la congelación

55 La evaluación de los parámetros de movilidad de los espermatozoides, VAP, PROG y RAP, se llevó a cabo mediante análisis automatizado como se describe en el Ejemplo 2.

* Se llevó a cabo un estudio inicial *in vitro* con semen de seis sementales adultos de Gales, a razón de dos eyaculados por semental.

60 La Figura 5 es un histograma que muestra los resultados obtenidos para los parámetros de movilidad VAP, PROG y RAP. Las barras blancas representan los resultados de cada uno de los tres parámetros evaluados después de congelar los espermatozoides en el medio INRA96®+YH+G, y las barras negras representan los resultados de cada uno de los tres parámetros evaluados después de congelar los espermatozoides en el medio INRA96®+plasmaYH+G. Las barras de error representan la desviación estándar.

65

Estos resultados muestran que la velocidad media (VAP) es significativamente superior cuando el semen se congela en el medio INRA96@+YH+G comparada con el medio INRA96@+plasmaYH+G ($58 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ frente a $55,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, $p < 0,05$); sin embargo, no hay evidencias de diferencia alguna entre los 2 medios para los parámetros porcentaje de de espermatozoides rápidos (Rapid) y porcentaje de espermatozoides progresivos (Prog) (44% frente al 44% y 31% frente al 30%, respectivamente, $p > 0,05$).

* Se llevó a cabo un segundo estudio *in vitro* en eyaculados de dos sementales que se utilizaron posteriormente para la prueba de la fertilidad *in vivo* (véase más abajo), a razón de cuatro eyaculados para el semental MW438 y cinco eyaculados para el semental MW329. Los resultados del análisis automatizado obtenidos para el semental MW438 se muestran en la Figura 6.A, y los del semental MW329 se muestran en la Figura 6.B.

Estos resultados muestran un ligero aumento en la velocidad media de los espermatozoides después de la congelación en el medio INRA96+YH+G. No obstante, no hay ninguna diferencia entre los 2 medios para los parámetros "porcentaje de espermatozoides rápidos" y "porcentaje de espermatozoides progresivos". Estos resultados son comparables a los resultados obtenidos en el primer estudio.

B) Evaluación *in vivo* de la capacidad de fecundación del espermatozoides después de la congelación

La evaluación de la capacidad de fecundación de los espermatozoides procedentes de los sementales MW438 y MW329, después de la congelación en los medios INRA96+plasmaYH+G o INRA96+YH+G se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3.

En este estudio se utilizaron en total setenta ciclos de yeguas: 35 ciclos con espermatozoides previamente congelados en el medio INRA96@+plasmaYH+G, y 35 ciclos con espermatozoides previamente congelados en el medio INRA96@+YH+G. La fertilidad del semen de los sementales MW438 y MW329 se determinó, respectivamente, sobre 19 y 16 ciclos para cada uno de los medios INRA96@+plasmaYH+G y INRA96@+YH+G.

Los resultados se presentan en el histograma de la Figura 7. La fertilidad por ciclo está representada en la ordenada, y los sementales se presentan en la abscisa. Las barras blancas representan los resultados obtenidos después de la congelación del semen en el medio INRA96@+plasmaYH+G, y las barras negras representan los resultados obtenidos después de la congelación del semen en el medio INRA96@+YH+G. Las barras de error representan la desviación estándar.

Estos resultados muestran que la fertilidad por ciclo obtenida después de la inseminación artificial con los espermatozoides procedentes del semental MW438 y del semental MW329 congelados en el medio INRA96@+plasmaYH+G es del 68% y del 69%, respectivamente (13 gestaciones para 19 inseminaciones para MW438 y 11 gestaciones para 16 inseminaciones para MW329). La fertilidad por ciclo después de la congelación en el medio INRA96@+YH+G es del 47% (9 gestaciones para 19 inseminaciones) en el caso del semental MW438 y del 75% (12 gestaciones para 16 inseminaciones) para el semental MW329.

Estos resultados muestran que los espermatozoides congelados en el medio INRA96@+plasmaYH+G mantienen un alto nivel de fertilidad después de la congelación, similar a la observada después de la congelación con el medio INRA96@+YH+G.

En conclusión, estos resultados *in vitro* e *in vivo* demuestran que la yema de huevo entera puede ser reemplazada en el medio según la invención por plasma de yema de huevo irradiada sin afectar a la calidad de los espermatozoides, y especialmente a su capacidad para la fecundación.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un medio de dilución del esperma, compuesto por:

- 5 - un medio base que contiene los componentes adecuados para la dilución del esperma de una especie dada, dicho medio base comprende una solución de sales minerales e hidratos de carbono y no contiene leche;
- entre 1 y 100 g/l de fosfocaseinato nativo;
- 10 - del 0,5 al 12,5% en peso de materia seca de yema de huevo o del 0,4 al 10% en peso de materia seca de plasma de yema de huevo; y
- del 1 al 10% de glicerol;
- 15 para mejorar la capacidad de fecundación de espermatozoides debilitados por el proceso de congelación o por la clasificación de espermatozoides por citometría de flujo.

2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el medio de dilución del esperma comprende entre 10 y 50 g/l de fosfocaseinato nativo.

- 20 2. Uso según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** el medio de dilución del esperma comprende del 0,5 al 5% en peso de materia seca de yema de huevo o del 0,4 al 4% en peso de materia seca de plasma de yema de huevo.

- 25 3. Uso según la reivindicación 3, **caracterizado porque** el medio de dilución del esperma comprende del 1 al 2,5% de yema de huevo o del 0,8 al 2% en peso de materia seca de plasma de yema de huevo, y del 2 al 5% de glicerol.

4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el medio base contiene aditivos como antibióticos o antifúngicos.

30

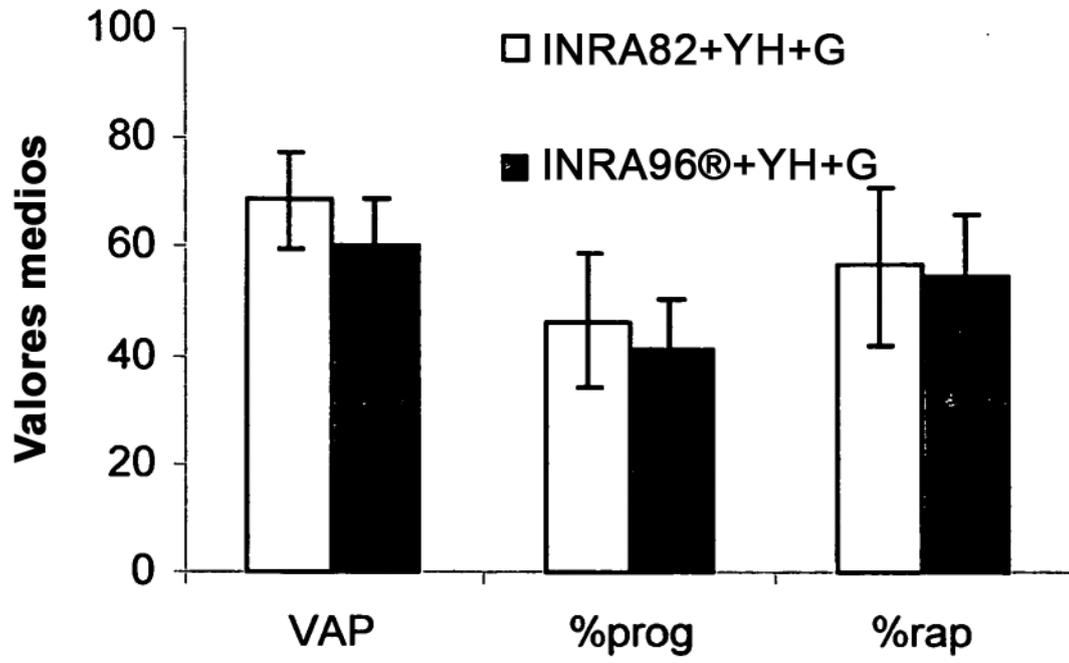


FIGURA 1

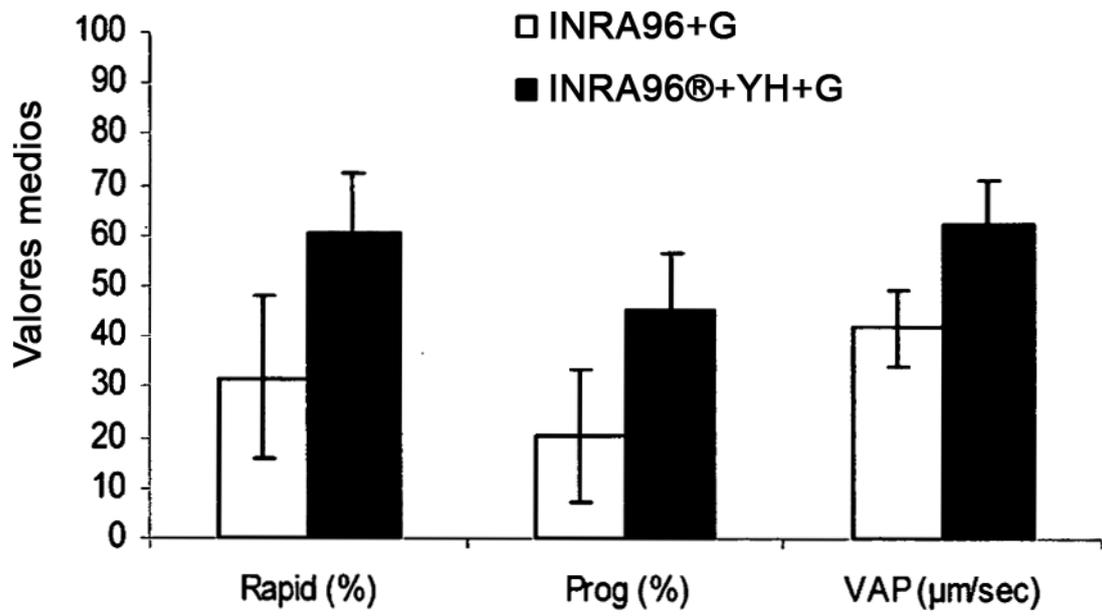


FIGURA 2

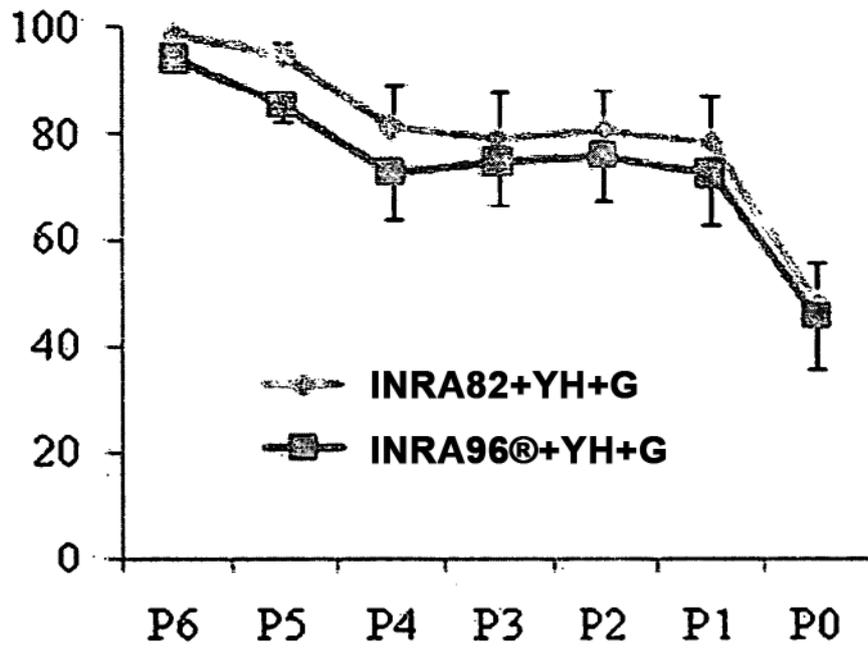


FIGURA 3

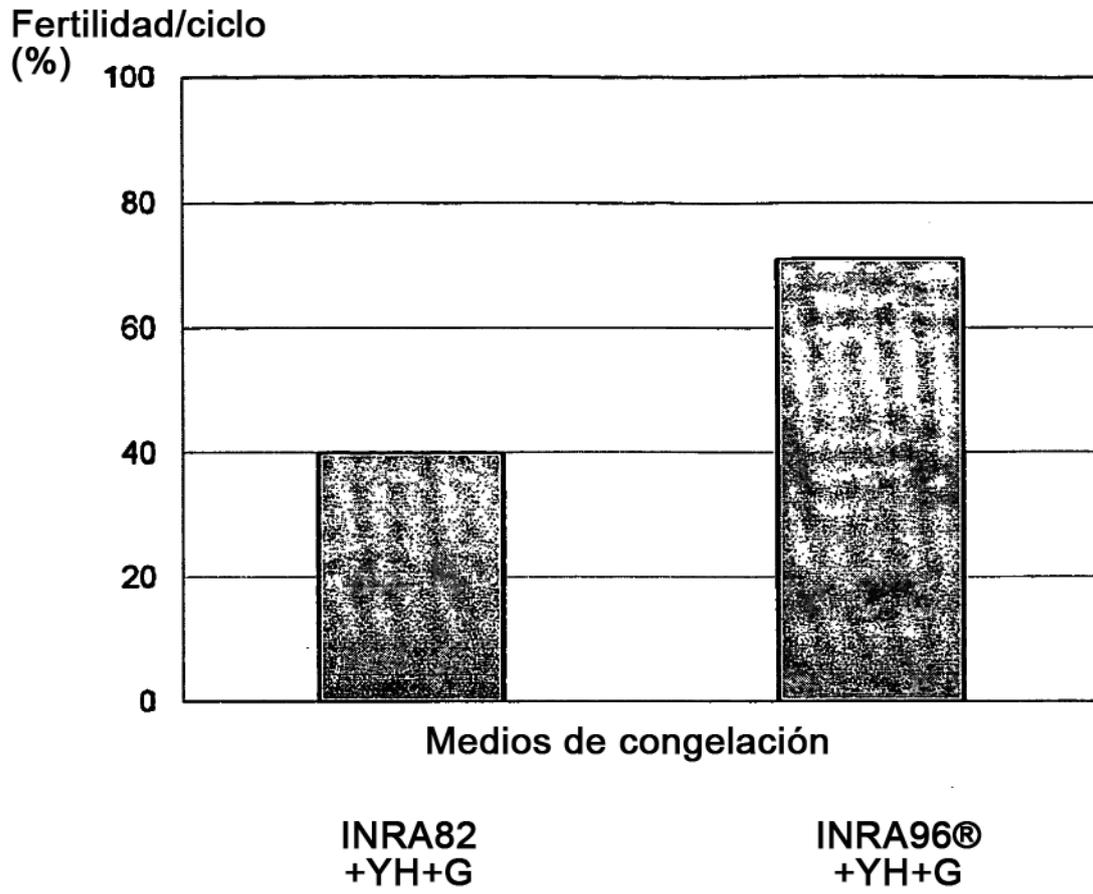


FIGURA 4

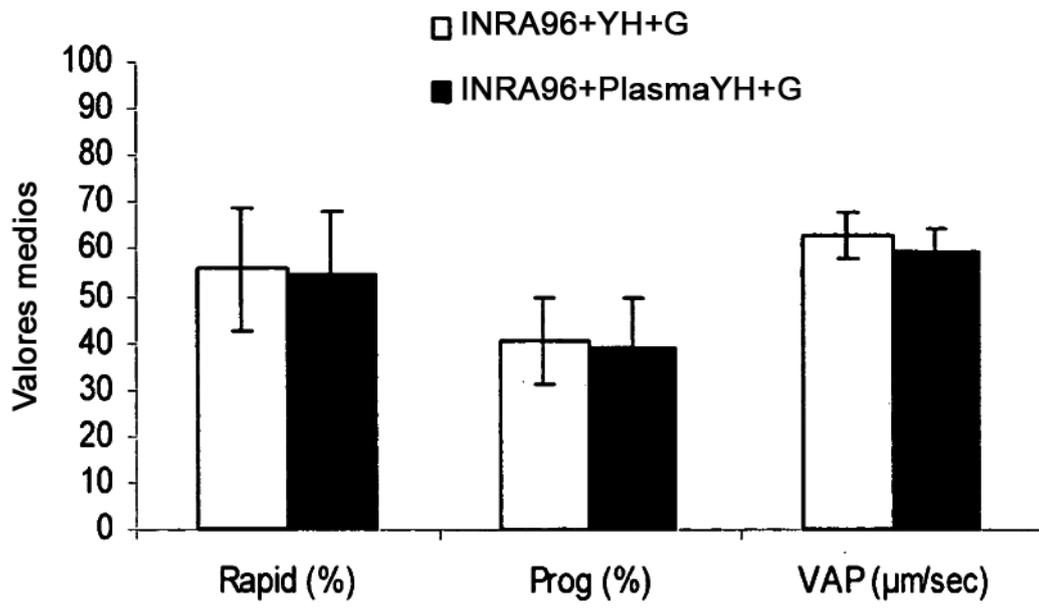
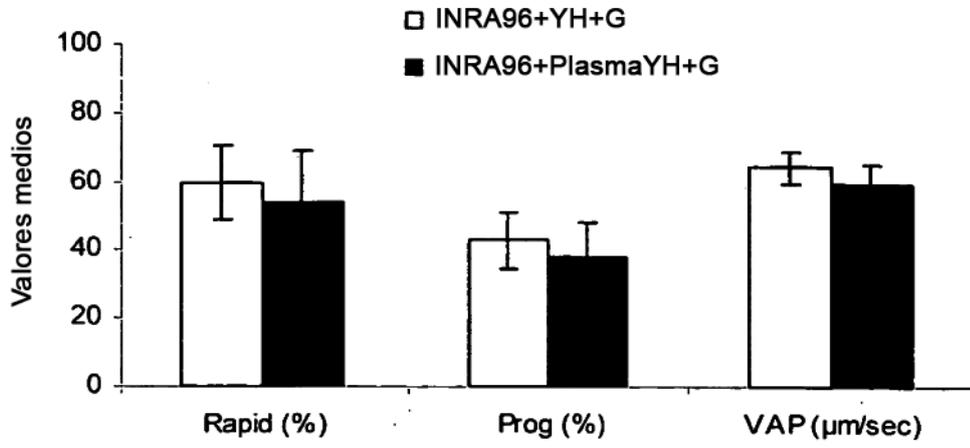


FIGURA 5

A



B

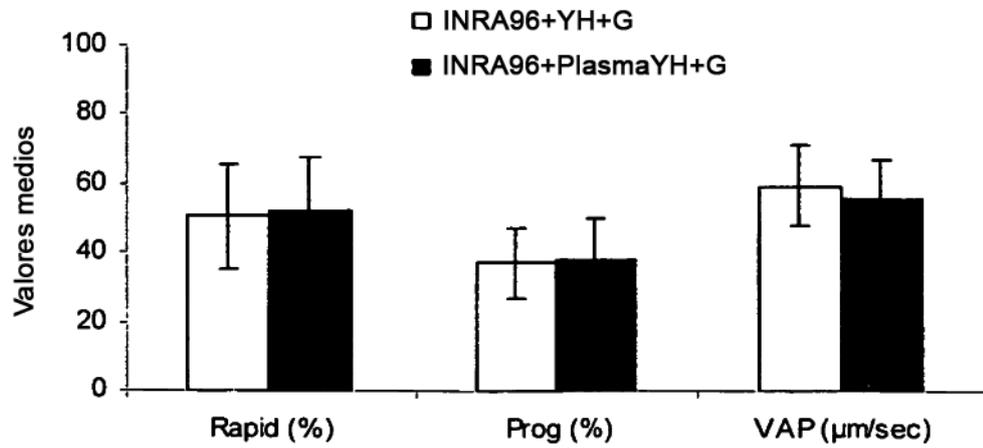


FIGURA 6

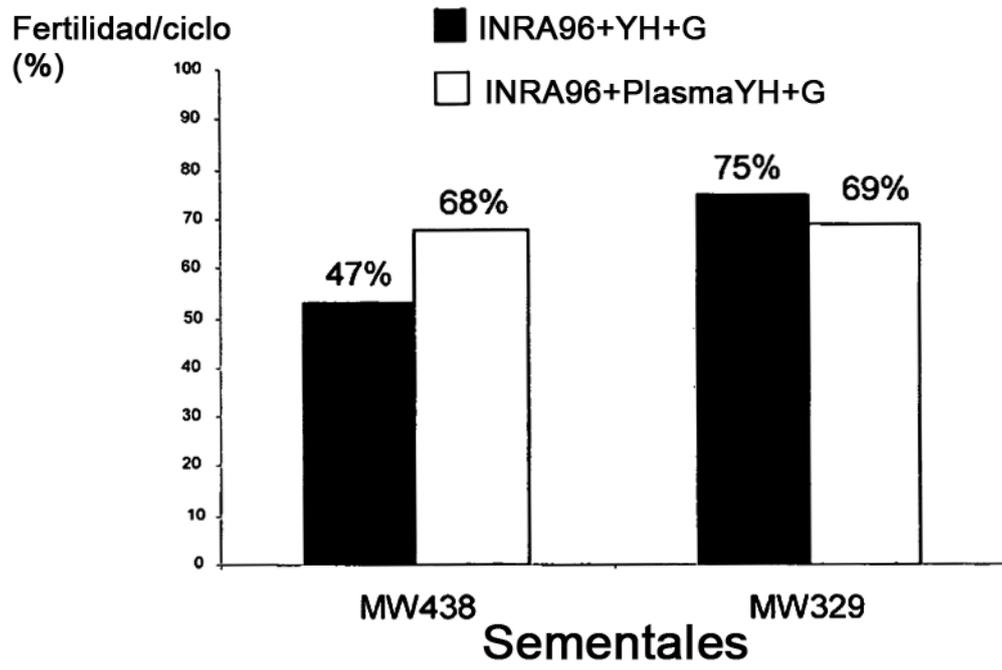


FIGURA 7