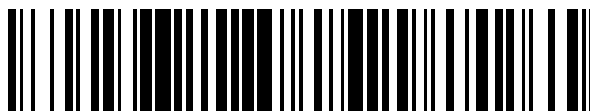


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 086**

21 Número de solicitud: 201130337

51 Int. Cl.:

**C12N 5/07** (2010.01)

**C12N 5/02** (2006.01)

**A01N 1/02** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **11.03.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**08.10.2012**

71 Solicitante/s:

**UNIVERSIDAD DE LEÓN** (Titular 66,67%)  
**Avda. de la Facultad, nº 25- Edificio Rectorado**  
**24071 León, León, ES**  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES**  
**CIENTÍFICAS** (Titular 33,33%)

72 Inventor/es:

**ROBLES RODRÍGUEZ, VANESA;**  
**MARTÍNEZ PASTOR, FELIPE y**  
**VILLANUEVA LÓPEZ, ROGER**

74 Agente/Representante:

**Ungría López, Javier**

54 Título: **MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN INDEFINIDA DE ESPERMA DE CEFALÓPODOS**

57 Resumen:

Método para la conservación indefinida de esperma de cefalópodos.

La presente invención reivindica un método de conservación a largo plazo del esperma de cefalópodos mediante la criopreservación de sus espermatozoides y espermatangios. La criopreservación se obtiene mediante el empleo de protocolos óptimos de incorporación y eliminación de crioprotectores permeables (alcoholes, sulfóxidos y formamidas en solución acuosa), y rampas de congelación y descongelación adecuadas. El método aquí descrito presenta una elevada utilidad en la cría en cautividad de especies de cefalópodos con interés comercial, en la conservación de especies en peligro de extinción y en investigaciones que desarrollan técnicas de fertilización in vitro en cefalópodos.

ES 2 388 086 A1

## DESCRIPCIÓN

**MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN INDEFINIDA DE ESPERMA DE CEFALÓPODOS**

La presente invención se engloba en el sector técnico de la preservación de  
5 células vivas de invertebrados. También pertenece al sector de la preservación de partes vivas de animales. En cuanto a la aplicación de la invención, pertenece al sector de la cría de invertebrados.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

10

La presente invención presenta un método para la conservación de espermatozoides de cefalópodo, en suspensión o mantenidos en el interior de espermatóforos y/o espermatangios, los cuales pueden conservarse enteros o seccionados en porciones.

15

Los cefalópodos constituyen un grupo de invertebrados marinos de gran interés para la industria alimentaria y así como con aplicaciones en industria farmacéutica y cosmética; e.g., patentes KR20080086751, KR100659040, US2005129739), o para investigación en biomedicina (Lee *et al.* 1994). Los cefalópodos se obtienen  
20 principalmente mediante actividades pesqueras, capturándose 4.313.510 toneladas en el año 2007, con un valor de 7.351 millones de US\$ (FAO 2009), principalmente calamares de los géneros *Dosidicus*, *Illex* y *Todadores*. No obstante, al contrario que otras especies acuáticas, la producción mediante acuicultura es aún muy reducida, produciéndose sólo 30 toneladas. Aún así  
25 informes de expertos indican que los esfuerzos para establecer cultivos intensivos y semi-intensivos de estos animales deberían intensificarse, debido a las características propias de este grupo de rápido crecimiento y riqueza en proteína, su importancia económica actual, el estado de las pesquerías y la proyección futura de su creciente consumo (Sykes *et al.*, 2006; Pierce *et al.* 2010).

30

La incipiente acuicultura de cefalópodos se ha desarrollado principalmente con los géneros *Sepia* y *Octopus* (Vaz-Pires *et al.* 2004; Sykes *et al.*, 2006). En la última década se han realizado engordes de ejemplares subadultos de pulpo (*Octopus vulgaris*) con fines comerciales en el noroeste de la Península Ibérica (Chapela *et*

*al.* 2006; Rodríguez *et al.*, 2006). Existen varias patentes orientadas a la cría de cefalópodos, especialmente relacionadas con estructuras y métodos para el mantenimiento y engorde de individuos subadultos y adultos (e.g., CN201163931, ES2121700, JP2002360105, CN201160421, JP9023782, CN201204867, 5 CN101268767, CN101491226, CN101637141). El principal problema actualmente consiste en la cría de paralarvas y juveniles, habiéndose realizado progresos significativos en los últimos años (Iglesias *et al.*, 2007; Villanueva & Norman 2008; Jones *et al.*, 2010; Uriarte *et al.*, 2010), reflejados en algunas patentes para la cría de paralarvas (CN101317551, CN101455188) y fertilización *in vitro* en 10 cefalópodos (CN101703013, CN101427658). La patente CN101703034 propone un sistema para la cría de pulpo que incluye entornos para el apareamiento de los adultos, la puesta de huevos y la separación y cría de las paralarvas.

El esfuerzo realizado en investigación y su transferencia en tecnología permite 15 augurar un rápido crecimiento de la acuicultura de cefalópodos, y un incremento de su importancia relativa en la producción destinada a su consumo o utilización industrial. Al mismo tiempo que se mejoran las técnicas de cultivo de cefalópodos y se incrementa el rendimiento de las instalaciones, se pretende mantener el ciclo vital completo de las especies en cautividad. La presente invención se encuadra 20 en este contexto. La aplicación de tecnologías reproductivas ha permitido mejorar la gestión, reducir costes y facilitar programas de selección genética en otras especies (Gosden *et al.*, 2002). Dentro de estas tecnologías, la congelación de esperma, extendiendo su vida útil indefinidamente, tiene una importancia crucial, ya que ha permitido la extensión de programas de inseminación artificial, e incluso 25 el comercio de dosis seminales. La aplicación de esta tecnología en cefalópodos sería muy beneficiosa para mejorar el rendimiento de cultivos de especies oceánicas mediante fertilización *in vitro* (Sakurai *et al.* 1995), para la selección de stocks de progenitores (Iglesias *et al.* 2007), así como para la conservación de especies en peligro de extinción (Freeman *et al.*, 2010).

30

En la actualidad no existe publicado ningún estudio científico ni ninguna patente en relación con la congelación de espermatozoides ni espermatóforos o espermatangios en cefalópodos. Existen varios estudios relacionados con la estructura y características morfológicas de los espermatozoides de varias

especies (Diaspro *et al.*, 1997; Giménez-Bonafé *et al.*, 2002; Giménez-Bonafé *et al.*, 2004; Cuccu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010), así como con la fisiología de los espermatóforos de cefalópodos (Austin *et al.*, 1964; Mann *et al.*, 1981; Naud *et al.*, 2006; Wada *et al.*, 2010).

5

Los espermatóforos constituyen estructuras características de cada especie y por ello tienen importancia taxonómica. Todas las especies de cefalópodos presentan estas estructuras, variando entre ellos el tamaño y la forma de los mismos. Generalmente son de forma tubular y encapsulan en su interior una masa  
10 espermiática (Austin *et al.*, 1964). Los espermatóforos de los cefalópodos son más elaborados que los de otros moluscos, y poseen la peculiaridad de poseer un mecanismo que, bajo ciertos estímulos mecánicos y durante la cópula, ejecuta la llamada reacción espermatofórica, durante la cual, el espermatóforo se evierte y forma un espermatangio que permanecerá anclado en diferentes superficies del  
15 cuerpo de la hembra. Los espermatozoides se forman en el testículo, vasos deferentes y espermiducto. Los espermatóforos, ya con esperma en su interior se almacenan finalmente en la bolsa de Needham del macho. Son transferidos a la hembra durante la cópula, generalmente mediante un brazo modificado denominado hectocótilo y/o un órgano similar a un pene denominado órgano  
20 terminal. Dependiendo de las especies los espermatangios pueden ser almacenados en receptáculos seminales de la hembra situados alrededor de la membrana bucal, o implantados directamente en el interior o exterior de la superficie del manto, cartílago nugal, la superficie de brazos y cabeza, o incluidos directamente en los oviductos distales e incluso llegar hasta el ovario. Días,  
25 semanas o meses después de la cópula, las hembras fertilizan sus oocitos utilizando los espermatozoides provenientes de estos espermatangios.

La movilidad espermiática se inicia por contacto con el agua de mar, pero dentro de los espermatóforos o de los espermatangios unidos a la hembra, los  
30 espermatozoides son quiescentes. Esto permite que los espermatozoides permanezcan viables durante largos periodos dentro de estas estructuras. Por lo tanto, los espermatóforos y espermatangios serían las estructuras adecuadas por sí mismas para criopreservar los espermatozoides de este grupo de moluscos, no siendo necesario congelar la masa espermiática por sí sola. Una vez

descongelados, la masa espermática sería extraída de estas estructuras y utilizada para fertilizar los oocitos (por ejemplo, utilizando métodos como los descritos en CN101703013 o CN101427658).

- 5 La criopreservación seminal es una técnica de gran utilidad para la conservación indefinida de material biológico. Las principales ventajas de la criopreservación se resumen a continuación:
- posibilidad de preservar o conservar el material genético;
  - posibilidad de analizar y comparar el material genético, entre varios individuos
- 10 de una misma especie;
- ayuda o facilitación de cruces, comparado con el cruce de animales formados;
  - posibilidad de seleccionar el entrecruzamiento más óptimo en función de por ejemplo las condiciones ambientales;
  - posibilidad de comprobar la ausencia de contaminación por agentes infecciosos;
- 15 - beneficio de preservar volúmenes reducidos de líquido, comparado con el mantenimiento de animales ya formados.

La técnica de criopreservación de espermatozoides se inició a mediados del siglo XX, y ha sido utilizada exitosamente en numerosas especies de mamíferos y,

20 progresivamente, en otros órdenes de vertebrados. En invertebrados acuáticos, los estudios se han ido incrementando, pero están aún limitados a unas pocas especies de equinodermos (erizos de mar y estrellas de mar), moluscos (ostras, oreja de mar y algunas almejas), poliquetos y crustáceos decápodos de interés comercial. La creación de bancos de esperma en estas especies tiene un enorme

25 potencial para los programas de hibridación, selección de razas o líneas genéticas, ginogénesis, domesticación y conservación de stocks genéticos (Gwo, 2000). Generalmente, el método para congelar espermatozoides de estas especies consiste en pasar la masa espermática o el espermatóforo intacto a un medio con crioprotector, congelar en vapores de nitrógeno líquido o un congelador

30 y mantener las muestras en un congelador o en nitrógeno líquido. La descongelación se realiza en un baño de agua o al aire. Obviamente, la metodología varía considerablemente de unos grupos a otros, dadas las diferencias filogenéticas que existen entre ellos. Por lo tanto, es preciso definir una metodología propia para cada grupo. En el caso de los cefalópodos, los

mecanismos reproductivos y la estructura básica del espermatóforo, con algunas excepciones, es similar en los distintos grupos, lo cual permite diseñar métodos comunes a distintas especies, con pequeños ajustes en varios parámetros (e.g., concentración de crioprotector). La única limitación apreciable para diseñar tal  
5 invención reside en el tamaño del espermatóforo, que en algunas especies de gran tamaño, por ejemplo en el pulpo gigante del Pacífico norte *Enteroctopus dofleini* y en el calamar gigante *Architeuthis*, pueden alcanzar un tamaño considerablemente mayor.

10 La ausencia de un método adecuado para la conservación a largo plazo del esperma de cefalópodo reduce significativamente tanto la posibilidad de cría en cautividad de algunas de estas especies de gran valor económico, como la creación de programas de conservación de especies de cefalópodos actualmente  
15 consideradas en peligro de extinción. Esta técnica nunca ha sido empleada en cefalópodos, ni se ha propuesto ninguna metodología con este fin. Esto hace que sea necesaria la búsqueda de un método para criopreservar los espermatozoides de cefalópodos, en suspensión o mantenidos en el interior de espermatóforos y/o espermatangios, mediante el empleo de protocolos óptimos de incorporación y eliminación de crioprotectores permeables, y rampas de congelación y  
20 descongelación adecuadas.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

El esperma de las especies de cefalópodos se encuentra constituyendo una masa  
25 espermática dentro de unas estructuras denominadas espermatóforos que reaccionan mecánicamente durante la cópula convirtiéndose en espermatangios, estado en el que se encuentran implantados en varias áreas corporales de hembras. El empleo de la técnica de criopreservación de la presente invención con los espermatozoides y/o los espermatóforos/espermatangios de estas  
30 especies de cefalópodos permitiría crear programas de conservación de especies en peligro de extinción y facilitaría la cría en cautividad de numerosas especies de cefalópodos oceánicos con elevado interés comercial. La realización de la técnica de criopreservación de la presente invención con los espermatóforos/espermatangios supone además una ventaja añadida frente a la

conservación de la masa espermática libre, puesto que facilita su manipulación y almacenamiento, además de asegurar que los espermatozoides se encuentren quiescentes. El método diseñado y propuesto en la presente invención para la criopreservación de los espermatozoides y/o los espermatóforos/espermatangios de cefalópodo utiliza sustancias crioprotectoras, tiempos y temperaturas de exposición que no resultan tóxicos para los espermatozoides, garantizando, por tanto, una excelente viabilidad espermática previa a la realización del procedimiento. Además, el protocolo de criopreservación de la presente invención ha sido diseñado para poder ser realizado en condiciones de campo sin necesidad de utilizar biocongeladores programables. El método puede ser utilizado de forma precisa pero sencilla, permitiendo incluso su empleo en buques pesqueros y oceanográficos, lo que potencia significativamente su valor y utilidad.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

Los espermatóforos (obtenidos de machos maduros) o espermatangios (obtenidos de hembras que han copulado) son enviados al laboratorio en refrigeración (4 °C a 10 °C), en una solución de agua de mar artificial o agua de mar filtrada. El presente procedimiento es útil tanto para aquellas especies que caracterizadas por espermatóforos/espermatangios de pequeño tamaño, que pueden almacenarse sin problemas en criotubos preferentemente de 2 mL a 5 mL o recipientes similares, como para especies con espermatóforos más grandes, desde 1 cm hasta 20 cm. En dichos espermatóforos de mayor longitud, éstos podrían cortarse en secciones preferentemente de 1 cm a 4 cm de longitud e incluirse en criotubos.

Antes de someter los espermatóforos/espermatangios al proceso de congelación, éstos son expuestos a las sustancias crioprotectoras. Se preparan las soluciones crioprotectoras en agua de mar (filtrada preferentemente a 0,2 µm (FSW) o también en agua de mar artificial (ASW)), a una concentración final preferentemente de 5% a 30%. Los estudios realizados muestran que los crioprotectores permeables del grupo de los sulfóxidos, específicamente el DMSO, proporcionan la mayor crioprotección. En cuanto a la toxicidad, hemos comprobado que los sulfóxidos, amidas y alcoholes (metanol y polialcoholes

como el glicerol, propanodiol, etilén glicol) presentan una toxicidad muy baja o inapreciable.

La temperatura y el tiempo de exposición han de ser adecuados y suficientes para garantizar la penetración del crioprotector en la estructura sin que éste resulte  
5 tóxico para las células espermáticas. Preferentemente los espermátóforos/espermatangios son expuestos al crioprotector (preferentemente de 0,5 mL a 2 mL) a una temperatura aproximada de 4 °C para reducir la toxicidad y durante un periodo de tiempo preferentemente de 5 min a 30 min, para asegurar la entrada del crioprotector (espermátóforos mayores requieren tiempos más  
10 prolongados). La exposición al crioprotector se puede realizar de una vez a la concentración final o en pasos sucesivos a concentraciones crecientes (por ejemplo, preferentemente a 5%, 10% y 20%), permaneciendo preferentemente de 2 min a 10 min en cada solución.

El espermátóforo/espermatangio se transfiere a un criovial preferentemente con  
15 0,5 mL a 2 mL de solución crioprotectora. El criovial se somete a un proceso de enfriamiento de manera que la muestra envasada siga una rampa de congelación predefinida, preferentemente de los 4 °C iniciales a una temperatura preferentemente de -80 °C o menor. Para conseguir la rampa de congelación óptima, los crioviales que contienen la muestra biológica son expuestos a vapores  
20 de nitrógeno líquido. Alternativamente, se puede utilizar un dispositivo biocongelador. Para ello se sitúan en un soporte flotante a una altura preferentemente entre 1 cm y 6 cm de la superficie del nitrógeno líquido, consiguiendo una rampa de congelación preferentemente de entre -5 °C/min a -40 °C/min. Los crioviales permanecen en los vapores un tiempo apropiado  
25 (preferentemente de 10 min a 30 min), hasta que la temperatura se equilibra con la de los vapores.

La muestra es almacenada en el tanque de nitrógeno líquido durante el tiempo deseado, ya que este procedimiento permite su conservación de forma indefinida. En caso necesario, se podría almacenar la muestra en un congelador de frío  
30 profundo (-80 °C), aunque la estabilidad de la muestra no se puede garantizar más allá de unas semanas.

Para la descongelación se utiliza un baño termostaticado a una temperatura preferentemente entre 20 °C y 40 °C, durante 30 s a 2 min, comprobando la descongelación de todo el contenido.



Tras la congelación, la muestra se somete al lavado de los crioprotectores. Este lavado consiste en la transferencia del espermátforo/espermatangio preferentemente a un volumen de 1 mL a 2 mL de solución de lavado. Se pueden realizar preferentemente de uno a cuatro lavados de este tipo, con un tiempo de 2  
5 min a 5 min en cada lavado. La solución de lavado puede consistir en FSW o ASW, o en crioprotector diluido en FSW o ASW a una concentración menor que la utilizada para congelar (por ejemplo, si se congela con crioprotector al 20%, se puede realizar un primer paso en crioprotector al 5% y un segundo paso en FSW o ASW).

10 El espermátforo/espermatangio es finalmente transferido a un tubo preferentemente con FSW o ASW para su utilización.

En una realización preferente de la invención se protege un método para la criopreservación del esperma de cefalópodos que comprende los siguientes  
15 pasos:

a) obtención del esperma de los individuos seleccionados, preferentemente el esperma de cefalópodos se encuentra contenido dentro de espermátforos o espermatangios,

b) preparación de la solución crioprotectora en una solución base a una  
20 concentración final entre 5% y 50% y en un caso preferente entre 5% y 30%, preferentemente dicha solución base es agua de mar filtrada o agua de mar artificial, más preferentemente la solución crioprotectora se selecciona entre: dimetilsulfóxido, compuestos del grupo de las amidas y alcoholes, aún más preferentemente la solución crioprotectora se selecciona entre: DMSO, metanol,  
25 glicerol, propanodiol y etilenglicol.

c) exposición del esperma a un volumen de solución crioprotectora entre 0.1 mL y 10 mL, y en un caso preferente entre 0,5 mL y 2 mL, a una temperatura entre 0 °C y 25 °C, preferentemente de 10 °C, y más preferentemente de 4 °C, durante 0 a 2 h, en un caso preferente durante 5 min a 30 min, en un criovial,

30 d) enfriamiento por rampa de congelación del criovial a una velocidad entre -1 °C/min y -100 °C/min, en un caso preferente entre -5 °C/min y -40° C/min, desde una temperatura de +25 °C a por lo menos -20 °C, en un caso más referente desde una temperatura de +4 °C a -80 °C.

En un caso preferente el método para la criopreservación de esperma de

cefalópodos está caracterizado porque los espermátóforos o espermatangios se encuentran enteros o bien seccionados preferentemente en secciones de entre 1 cm y 4 cm de longitud, antes de introducirse en los criotubos o crioviales.

- 5 En una realización preferente, el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque los individuos seleccionados pertenecen a una especie de cefalópodos cuyos espermátóforos y espermatangios presentan un tamaño desde 1 cm hasta 20 cm, pudiendo ser almacenados en criotubos de 2 mL a 5 mL, o recipientes similares, enteros o en secciones preferentemente de 10 cm a 4 cm de longitud.

En una realización más preferente, el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque los individuos seleccionados pertenecen a una especie de cefalópodos cuyos espermátóforos y 15 espermatangios se pueden almacenar sin problemas en criotubos de 2 mL a 5 mL, o recipientes similares, enteros o en secciones preferentemente de 1 cm a 4 cm de longitud.

En una realización más preferente dicha especie de cefalópodos pertenece a 20 cualquier orden, aunque preferentemente pertenece a uno de los siguientes ordenes: *Nautilida*, *Spirulida*, *Sepiida*, *Sepiolida*, *Teuthida*, *Octopodida* y *Vampyromorphida*. En una realización más preferente dicha especie pertenece al género *Sepia* o al género *Octopus*, y más preferentemente a la especie Volador *Illex coindetii* o *Illex coindetii* Volador.

25

En otra realización más preferente en el paso a) se conserva el esperma a una temperatura entre 4 °C y 10 °C en una solución base que es agua de mar filtrada o agua de mar artificial.

- 30 En otra realización más preferente el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque los pasos b) y c) se repiten con concentraciones finales crecientes, a intervalos de 1%, hasta 25% del diluyente, preferentemente de 5%, 10% y 20% y tiempos de equilibrado entre 1 min y 120 min, preferentemente entre 2 min y 10 minutos, del esperma diluido.

En otra realización más preferente el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque el paso d) de enfriamiento por rampa de congelación es por exposición a vapores de nitrógeno líquido o en un  
5 congelador o dispositivo biocongelador, de -20 °C a -130 °C. Preferentemente la exposición a vapores de nitrógeno líquido se realiza situando un soporte flotante a una altura entre 0,5 cm a 10 cm, preferentemente entre 1 cm y 6 cm, de la superficie de nitrógeno líquido, más preferentemente durante 2 min a 120 min, en un caso preferente durante 10 min a 30 min.

10

En otra realización más preferente el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque puede comprender los siguientes pasos adicionales:

15 e) descongelación del esperma criopreservado, a una temperatura entre 4°-80 °C, preferentemente entre 20 °C y 40 °C, y más preferentemente entre 20 °C a 35 °C, por un periodo de tiempo entre 2 s y 60 min, preferentemente entre 30 s y 5 min, y más preferentemente entre 30 s y 2 min, y, adicionalmente,

20 f) lavado del esperma descongelado con un volumen entre 0.5 mL a 10 mL, preferentemente entre 1mL – 2mL, de una solución de lavado, por un periodo de tiempo de hasta 60 min, en un caso preferente por un periodo de tiempo entre 2 min y 5 min, a una temperatura de 4 °C a 25 °C. En un caso más preferente el lavado se puede repetir al menos entre 1 y 4 veces.

25 En un caso particular, la solución de lavado puede ser agua, agua de mar filtrada o agua de mar artificial.

En otra realización más preferente el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque la solución de lavado del paso f) es  
30 solución crioprotectora diluida en solución base, preferentemente agua de mar filtrada o agua de mar artificial, a una concentración menor que la empleada en el paso b).

En la presente invención se entiende por “Criopreservación” el proceso mediante el cual se congelan y mantienen muestras biológicas a muy bajas temperaturas (generalmente entre -80 °C y -196 °C).

En la presente invención se entiende por “Cefalópodo” un invertebrado marino de la Clase Cephalopoda perteneciente al Filo Mollusca. Incluye los Ordenes: Nautilida, Spirulida, Sepiida, Sepiolida, Teuthida, Octopodida y Vampyromorphida. Comprende 47 Familias, 139 géneros y algo más de 700 especies, acorde con la última clasificación comúnmente aceptada por especialistas en este grupo (Sweeney and Roper 1998).

10 En la presente invención se entiende por “Solución Base” la mezcla homogénea de dos o más sustancias sobre las que se añaden los agentes crioprotectores.

En la presente invención se entiende por “Solución crioprotectora” el compuesto químico que protege a la muestra biológica durante el proceso de enfriamiento y congelación/descongelación.

15 En la presente invención se entiende por “Preparación de la solución crioprotectora” el proceso mediante el cual los agentes crioprotectores se diluyen en la solución base, en concentraciones parciales crecientes o a concentración final.

En la presente invención se entiende por “Dilución de la solución crioprotectora” el proceso mediante el cual se reduce la concentración de la solución crioprotectora mediante uno o más pasos de lavado en soluciones sin crioprotector o con concentraciones decrecientes de crioprotector.

En la presente invención se entiende por “Concentración del agente crioprotector” la proporción o relación entre la cantidad de agente crioprotector y el volumen final de la solución, entre 5% y 50%.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de tiempo de exposición a la solución crioprotectora” al rango de tiempos en el que la muestra biológica es expuesta a la solución crioprotectora, de 0 a 2 h.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de temperatura de exposición a la solución crioprotectora” al rango de temperaturas en el que la muestra biológica es expuesta a la solución crioprotectora, de 0 °C a 25 °C.

En la presente invención se entiende por “Velocidad de rampa de enfriamiento” la disminución de la temperatura de la muestra en un tiempo determinado, que puede ser variable o constante, de -1 °C/min a -1000 °C/min.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de tiempo de enfriamiento” la duración del proceso durante el cual se somete al esperma, espermatangio, espermatóforo o al tubo que los contiene a una temperatura inferior, fija o decreciente, para conseguir su enfriamiento y congelación. Este intervalo de  
5 tiempo de enfriamiento puede extenderse de 2 min a 120 min.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de temperatura de enfriamiento” el rango de temperaturas a las que se encuentra la muestra de esperma, espermatangio o espermatóforo tras el enfriamiento. Esta temperatura puede abarcar de -20 °C a -120 °C.

10 En la presente invención se entiende por “Intervalo de tiempo de descongelación” la: duración del proceso (de 2 s a 60 min) durante el cual se somete al tubo que contiene la muestra a una temperatura por encima del punto de congelación del medio crioprotector, para que, al menos, el medio se descongele completamente.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de temperatura de  
15 descongelación” el rango de temperaturas a las que se somete la muestra congelada para su descongelación. Pueden utilizarse temperaturas de 4 °C a 80 °C.

En la presente invención se entiende por “Solución de lavado” la solución sin crioprotector o con una concentración de crioprotector menor que la solución  
20 crioprotectora, utilizada para reducir la cantidad de crioprotector de la muestra.

En la presente invención se entiende por “Preparación de la solución de lavado” la preparación de la solución base con concentraciones decrecientes del agente crioprotector o sin crioprotector.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de tiempo de exposición a la  
25 solución de lavado” la duración de la exposición de la muestra de esperma a la solución de lavado (uno o varios pasos), abarcando cada paso hasta 60 min.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de temperatura de exposición a la solución de lavado” el rango de temperaturas a las que se somete la muestra descongelada a la solución o soluciones de lavado. Pueden utilizarse  
30 temperaturas de 4 °C a 25 °C.

En la presente invención se entiende por “Viabilidad espermática” la proporción de espermatozoides viables (con la membrana plasmática intacta según una tinción de vitalidad celular (ioduro de propidio, YO-PRO-1, etc.) respecto a la población total de espermatozoides de una muestra.

En la presente invención se entiende por “Movilidad espermática” la proporción de espermatozoides con movimiento propio (evaluados mediante microscopía) respecto a la población total de espermatozoides de una muestra.

## 5 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Efecto de la combinación de crioprotectores al 15% y tiempos (DMS: dimetilsulfóxido; ETG: etilenglicol; GLY: glicerol; MET: metanol; PPD: propanodiol). La línea base es el control (viabilidad:  $55,4 \pm 6,2$ ). Los resultados se muestran como intervalos de confianza al 95% del valor medio del efecto (círculos).

**Figura 2.** Criopreservación de espermátóforos usando DMSO al 15% y criotubos colocados en posición horizontal o vertical sobre los vapores de nitrógeno líquido (media y error estándar del porcentaje de espermatozoides con membranas dañadas).

**BIBLIOGRAFÍA**

- Austin, C. R., Lutwak-Mann, C., Mann, T. (1964). Spermatophores and spermatozoa of the squid *Loligo pealii*. Proc R Soc Lond B Biol Sci 161:143-52.
- 5 - Chapela, A.G., A.F; Dawe, E.G; Rocha, F.J; Guerra, A, 2006. Growth of common octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts. Sci. Mar. 70, 121-129.
- Cuccu, D., Mereu, M., Cannas, R., Follesa, M. C., Cau, A., Jereb, P. (2007). Egg clutch, sperm reservoirs and fecundity of *Neorossia caroli* (Cephalopoda : Sepiolidae) from the southern Sardinian sea (western Mediterranean). J Mar Biol
- 10 Assoc UK 87:971-976.
- Diaspro, A., Beltrame, F., Fato, M., Palmeri, A., Ramoino, P. (1997). Studies on the structure of sperm heads of *Eledone cirrhosa* by means of CLSM linked to bioimage-oriented devices. Microsc Res Tech 36:159-64.
- Freeman, D., Marshall, B., Ahyong, S., Wing, S., Hitchmough, R., 2010.
- 15 Conservation status of New Zealand marine invertebrates, 2009. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 44, 129 - 148.
- Gimenez-Bonafé, P., Ribes, E., Zamora, M. J., Kasinsky, H. E., Chiva, M. (2002). Evolution of octopod sperm I: comparison of nuclear morphogenesis in *Eledone* and *Octopus*. Mol Reprod Dev 62:357-62.
- 20 - Giménez-Bonafé, P., Soler, F. M., Buesa, C., Sautière, P.-E., Ausió, J., Kouach, M., Kasinsky, H. E., Chiva, M. (2004). Chromatin organization during spermiogenesis in *Octopus vulgaris*. II: DNA-interacting proteins. Mol Reprod Dev 68:232-9.
- Gosden, R., Nagano, M. (2002). Preservation of fertility in nature and ART.
- 25 Reproduction 123:3-11.
- Gwo, J.-C. (2000). Cryopreservation of aquatic invertebrate sperma: a review. Aquac Res 31:259-271.
- Iglesias, J., Sánchez, F. J., Bersano, J. G. F., Carrasco, J. F., Dhont, J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J. L., Okumura, S., Roo, J., van der Meeren, T., Vidal, E. A.
- 30 G., Villanueva, R. (2007). Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. Aquaculture 266:1-15.
- Jones, N. J. E., Richardson, C. A. (2010). Laboratory culture, growth, and the life cycle of the little cuttlefish *Sepiola atlantica* (Cephalopoda: Sepiolidae). Journal of Shellfish Research 29:241-246.

- Lee, P.G., Turk, P.E., Yang, W.T., Hanlon, R.T., 1994. Biological characteristics and biomedical applications of the squid *Sepioteuthis lessoniana* cultured through multiple generations. *Biological Bulletin* 186, 328-341.
- Li, Z., Zhu, J.-Q., Yang, W.-X. (2010). Acrosome reaction in *Octopus tankahkeei* 5 induced by calcium ionophore A23187 and a possible role of the acrosomal screw. *Micron* 41:39-46.
- Mann, T., Martin, A. W., Thiersch, J. B. (1981). Changes in the spermatophoric plasma during spermatophore development and during the spermatophoric reaction in the giant octopus of the North Pacific, *Octopus dofleini martini*. *Mar Biol* 10 63:121-127.
- Naud, M.-J., Havenhand, J. (2006). Sperm motility and longevity in the giant cuttlefish, *Sepia apama* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Biology* 148:559-566.
- Pierce, G.J., Allcock, A.L., Bruno, I., Bustamante, P., González A., F., Guerra, A., Jereb, P., Lefkaditou, E., Malham, S.K., Moreno, A., Pereira, J., Piatkowski, U., 15 Rasero, M., Sánchez, P., Santos, M.B., Santurtun, M., Seixas, S., Sobrino, I., Villanueva, R., 2010. Cephalopod biology and fisheries in Europe. In: Anderson, E.D. (Ed.), ICES Cooperative Research Report. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, pp. 175.
- Rodríguez, C., Carrasco, J., Arronte, J. C., Rodríguez, M. (2006). Common 20 octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile ongrowing in floating cages. *Aquaculture* 254:293-300.
- Sakurai, Y., Young, R.E., Hirota, J., Mangold, K., Vecchione, M., Clarke, M.R., Bower, J., 1995. Artificial fertilization and development through hatching in the oceanic squids *Ommastrephes bartramii* and *Sthenoteuthis oualaniensis* 25 (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Veliger* 38, 185-191.
- Sweeney, M.J., Roper, C.F.E., 1998. Classification, type localities, and type repositories of recent Cephalopoda. *Smithsonian Contributions to Zoology* 586, 561-599.
- Sykes, A. V., Domingues, P. M., Correia, M., Andrade, J. P. (2006). Cuttlefish 30 culture - : State of the art and future trends. *Vie et Milieu* 56:129-137.
- Uriarte, I., Hernández, J., Dörner, J., Paschke, K., Farías, A., Crovetto, E., Rosas, C. (2010). Rearing and growth of the octopus *Robsonella fontaniana* (Cephalopoda: Octopodidae) from planktonic hatchlings to benthic juveniles. *Biol Bull* 218:200-10.



- Vaz-Pires, P., Seixas, P., Barbosa, A., 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. *Aquaculture* 238, 221-238.
- Villanueva, R., Norman, M.D., 2008. Biology of the planktonic stages of benthic  
5 octopuses, *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 46: 105-202.
- Wada, T., Takegaki, T., Mori, T., Natsukari, Y. (2010). Sperm removal, ejaculation and their behavioural interaction in male cuttlefish in response to female mating history. *Anim Behav* 79:613-619.; 80:177-82.
- Zhang *et al.* 2005, *Nat Cell Biol*; 7: 909-915.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de  
 5 patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos  
 se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como  
 limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos  
 descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de  
 la misma.

10

### EJEMPLO 1.

#### **Toxicidad de los crioprotectores:**

Se ha comprobado que existe una gran variabilidad en otras especies de  
 15 moluscos en cuanto a la toxicidad de los crioprotectores sobre los  
 espermatozoides. En cambio, no parece existir una toxicidad acusada para los  
 espermatozoides de cefalópodo mantenidos en espermatóforos/espermatangios y  
 expuestos a distintos crioprotectores.

20 Los espermatóforos/espermatangios de *Volador Illlex coindetii* (calamar oceánico  
 presente en aguas atlánticas y mediterráneas) se introdujeron en crioviales  
 conteniendo 1 mL de crioprotector al 15% en FSW. Los crioprotectores  
 ensayados en este ejemplo fueron DMSO, metanol, glicerol, propanodiol y etilén  
 glicol. Se realizaron varias réplicas para ensayar la viabilidad de los  
 25 espermatozoides (espermatozoides positivos a Hoechst 33342, indicador de  
 rotura de membrana; evaluación mediante citometría de flujo) tras 5 min, 15 min y  
 30 min a 4 °C. Tras el tiempo correspondiente, los espermatóforos se lavaron en  
 dos pasos (1 mL del crioprotector al 5% y 1 mL de FSW, 2 min en cada solución).  
 Dentro de cada combinación de tiempo y temperatura se realizó un triplicado. Se  
 30 comprobó la presencia de espermatozoides móviles mediante microscopía de  
 contraste de fases.

En los resultados (Fig. 1).se comprobó que no había evidencia clara de toxicidad.  
 No obstante, se observó una tendencia hacia un efecto negativo del glicerol,

especialmente a los 30 min. En todos los casos se observó movilidad espermática.

## **EJEMPLO 2**

### **5 Criopreservación de espermátóforos en vapores de nitrógeno líquido:**

Los espermátóforos/espermatangios fueron introducidos en crioviales conteniendo 1 mL de DMSO al 15% en FSW. La exposición al crioprotector se realizó a 4 °C durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo, los crioviales fueron colocados en un soporte flotante a 2 cm de la superficie del nitrógeno líquido en dos  
10 configuraciones: vertical en una gradilla de plástico y horizontal. El conjunto se encuentra dentro de una caja aislante con tapa. Tras 30 min, los crioviales se sumergieron en el nitrógeno líquido y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

15 Para la descongelación, los crioviales se introdujeron en un baño termostatzado a 30 °C durante 2 min 20 s. Se añadió inmediatamente 1 mL de FSW a 4 °C al criovial. Tras 1 min, el espermátóforo/espermatangio se capturó con pinzas y se colocó en un pocillo de una placa de 24 pocillos conteniendo una solución del crioprotector diluida 1/4 en FSW respecto a la solución crioprotectora utilizada  
20 para la congelación. Transcurrido 1 min, el espermátóforo/espermatangio se colocó en otro pocillo de la placa con FSW. Un minuto después, el espermátóforo/espermatangio se procesó para extraer la masa espermática para su análisis, evaluando la viabilidad espermática como en el caso del experimento de toxicidad.

25

Tras la congelación, la mayoría de los espermatozoides tenían daños de membrana si los criotubos se habían colocado en posición vertical, pero esta proporción se redujo en los espermátóforos que se habían congelado con los criotubos en posición horizontal (Fig. 2). Posiblemente, cuando los criotubos se  
30 colocan en posición horizontal, se evita un gradiente de temperatura que puede perjudicar la congelación.

## **EJEMPLO 3.**

### **Criopreservación de espermátóforos a -80 °C:**

Los espermátóforos/espermatangios fueron introducidos en crioviales conteniendo 1 mL de crioprotector al 15% en FSW. Los crioprotectores utilizados fueron DMSO, etilenglicol y glicerol. La exposición al crioprotector se realizó a 4 °C durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo, los crioviales fueron colocados en una  
5 caja isoterma para conseguir un enfriamiento lento. La caja se introdujo en un congelador a -80 °C.

Para la descongelación, los crioviales se introdujeron en un baño termostático a 30 °C durante 2 min 20 s. Se añadió inmediatamente 1 mL de FSW a 4 °C al criovial. Tras 1 min, el espermátóforo/espermatangio se capturó con pinzas y se  
10 colocó en un pocillo de una placa de 24 pocillos conteniendo una solución del crioprotector diluida 1/4 en FSW respecto a la solución crioprotectora utilizada para la congelación. Transcurrido 1 min, el espermátóforo/espermatangio se colocó en otro pocillo de la placa con FSW. Un minuto después, el espermátóforo/espermatangio se procesó para extraer la masa espermática para  
15 su análisis, evaluando la viabilidad espermática como en el caso del experimento de toxicidad.

Tras la descongelación, no se recuperaron espermatozoides viables, excepto en el tratamiento con DMSO (6,3±2,2%).

## REIVINDICACIONES

1. Método para la criopreservación del esperma de cefalópodos que comprende los siguientes pasos:
  - 5 a) obtención del esperma de los individuos seleccionados,
  - b) preparación de la solución crioprotectora en una solución base a una concentración final entre 5% y 50%,
  - c) exposición del esperma a un volumen de solución crioprotectora entre 0,1 mL y 10 mL, a una temperatura entre 0 °C a 25 °C, de 0 a 2 h en un  
10 criovial,
  - d) enfriamiento por rampa de congelación del criovial a una velocidad entre -1 °C/min y -100 °C/min, desde una temperatura de +25 °C a por lo menos -20 °C.
  
- 15 2. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 1, caracterizado porque el esperma de cefalópodo está contenido dentro de espermátóforos o espermátangios.
  
3. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la  
20 reivindicación 2, caracterizado porque los espermátóforos o espermátangios se encuentran enteros o en secciones de entre 1 cm y 4 cm.
  
4. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicha especie de cefalópodos  
25 pertenece a los Ordenes: Nautilida, Spirulida, Sepiida, Sepiolida, Teuthida, Octopodida y Vampyromorphida. .
  
5. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 4, caracterizado porque la especie de cefalópodo es *Illex coindetii*  
30 Volador.
  
6. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque en el paso a) se conserva el

esperma a una temperatura entre 4 °C y 10 °C en una solución base que es agua de mar filtrada o agua de mar artificial.

7. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la solución crioprotectora del paso b) se selecciona entre: dimetilsulfóxido, compuestos del grupo de las amidas y alcoholes.

8. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 7, caracterizado porque la solución crioprotectora del paso b) se selecciona entre: DMSO, metanol, glicerol, propanodiol y etilenglicol.

9. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los pasos b) y c) se repiten con concentraciones finales crecientes a intervalos de 1 a 25% del diluyente y tiempos de equilibrado entre 1 min y 120 min del esperma diluido.

9. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el paso d) de enfriamiento por rampa de congelación está seleccionado del grupo que comprende: por exposición a vapores de nitrógeno líquido, en un congelador de -20 °C a -130 °C y en un dispositivo biocongelador.

10. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 9, caracterizado porque la exposición a vapores de nitrógeno líquido se realiza situando un soporte flotante a una altura entre 0,5 cm y 10 cm de la superficie de nitrógeno líquido, por un periodo de tiempo entre 2 min y 120 min.

11. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende los siguientes pasos adicionales:

e) descongelación del esperma criopreservado, a una temperatura entre 4 °C - 80 °C, por un periodo de tiempo entre 2 s y 60 min, y

f) lavado del esperma descongelado con un volumen entre 0,5 mL y 10 mL de una solución de lavado, por un periodo de tiempo de hasta 60 min y a una temperatura de 4 °C a 25 °C.

5 12. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 11, caracterizado porque el paso f) se realiza al menos 1 vez.

13. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 11 o 12, caracterizado porque la solución de lavado del paso f) es  
10 agua de mar filtrada o agua de mar artificial.

14. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 11 o 12, caracterizado porque la solución de lavado del paso f) es solución crioprotectora diluida en solución base a una concentración menor que la  
15 empleada en el paso b).

FIG. 1

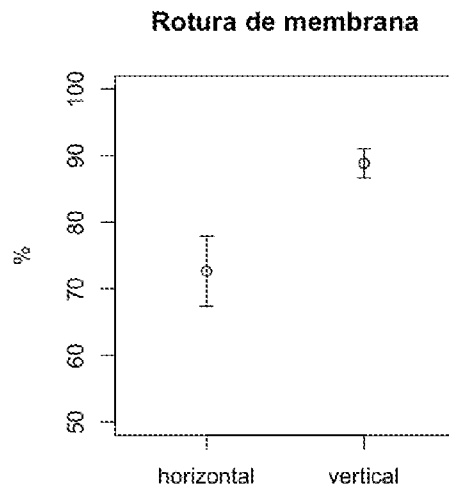
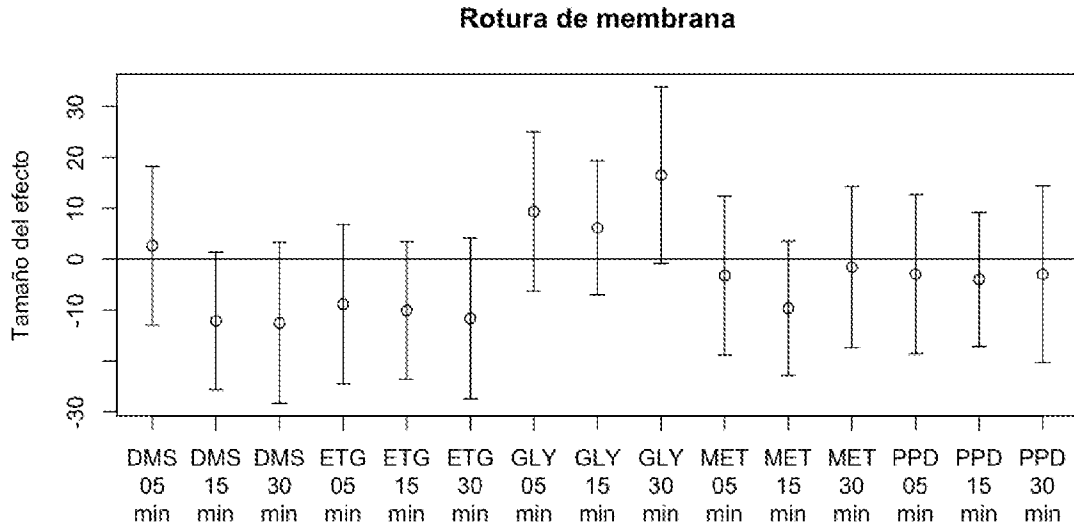


FIG. 2





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130337

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.03.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	NAUD, M.J Y HAVENHAND, J.N. Sperm motility and longevity in the giant cuttlefish, <i>Sepia apama</i> (Mollusca: Cephalopoda) Marine Biology, 2006, vol. 148, página 559-566.	1-14
Y	GWO, J-C. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. Aquaculture Research, 2000, vol. 31, páginas 259-271.	1-14
Y	ZHANG, T. Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species. Chapter 14. En: Life in the Frozen State. 2004. Edited by CRC Press. ISBN: 978-0-415-24700-9, páginas 415-435	1-14
Y	SMITH et al. Cryopreservation of shellfish sperm, eggs and embryos. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 2001, vol. 61, páginas 31-34.	1-14

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  
21.05.2012

Examinador  
A. I. Polo Díez

Página  
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N5/07** (2010.01)

**C12N5/02** (2006.01)

**A01N1/02** (2006.01)

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

C12N, A01N

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, OCEAN, AQUASCI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.05.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-14	<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	NAUD, M.J Y HAVENHAND, J.N	2006
D02	GWO, J-C.	2000
D03	ZHANG, T.	2004
D04	SMITH et al.	2001

**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**

La solicitud de patente se refiere a un método para la conservación de esperma de cefalópodos que comprende las etapas de:

- a) Obtención del esperma de los cefalópodos
- b) Preparar una solución crioprotectora en una solución base en la que el crioprotector se encuentra en una proporción de entre 5 y 50%.
- c) Exponer el esperma en un criovial a dicha solución a una temperatura de entre 0 a 25°C, **durante 0 a 2 horas.**
- d) Enfriar a una velocidad de entre -1 a -100°C/min hasta por lo menos -20°C.

Las reivindicaciones dependientes 2 a 10 dan detalles sobre el método de la reivindicación 1 y las reivindicaciones 11 a 14 detallan pasos adicionales como la descongelación del esperma posteriormente.

**Novedad y actividad inventiva (art. 6 y 8 de la L.P)**

Ningún documento del estado de la técnica divulga un método para la conservación de esperma de cefalópodos como el que se menciona en la primera reivindicación de la solicitud, por lo que esta reivindicación y las reivindicaciones dependientes cumplen el requisito de novedad.

El documento D1 es el documento más cercano del estado de la técnica ya que en él se describe varios métodos de conservación de esperma de una especie de cefalópodos (*Sepia apama*). Cuando el esperma se mantiene dentro de los espermatóforos y éstos se refrigeran a 4°C, la motilidad del esperma se observa incluso después de dos meses (figura 1).

La diferencia entre la primera reivindicación de la solicitud y el documento D1 es que el método de conservación de la solicitud supone el enfriamiento del esperma por debajo de -20°C. El esperma se ha podido exponer previamente a una solución crioprotectora o no (en el caso de que el tiempo de exposición a la solución crioprotectora sea de 0 horas, como se contempla en la etapa c) de la 1ª reivindicación) el método se llevaría a cabo sin utilizar la solución crioprotectora.

El problema técnico que intenta solucionar la invención es encontrar un método alternativo a la conservación del esperma de los cefalópodos y la manera de solucionarlo es enfriándolo por debajo de -20°C.

Varios documentos en el estado de la técnica describen la crioconservación (congelación por debajo de -20°C) de esperma de animales acuáticos de especies diversas (moluscos, crustáceos, equinodermos, poliquetos, peces, etc.) como un método muy adecuado para la conservación del mismo (ver documentos D1 a D4).

En general, para la crioconservación, el esperma o espermátforo se sumerge en una solución de agua salada y un crioprotector (DSMO, glicerol, etc.) en concentraciones de entre 5 a 40%, la congelación se lleva a cabo de manera controlada en vapor de nitrógeno y la descongelación en un baño a una temperatura de entre 10 y 30°C.

Un experto en la materia que buscara una manera alternativa de conservar esperma de cefalópodos intentaría la crioconservación, que ya ha sido utilizado en diversos animales acuáticos, con razonables posibilidades de éxito. Para llevar a cabo la crioconservación de una especie en concreto, dicho experto, debería desarrollar los correspondientes protocolos, adaptando el método general a la especie o especies en estudio, llevando a cabo la experimentación necesaria para elegir el crioprotector adecuado y optimizar las condiciones de congelación (temperatura, tiempo, velocidad de congelación) y de descongelación.

Tal y como están redactadas las reivindicaciones de la solicitud, éstas no se refieren a esas condiciones concretas ensayadas, sino que mencionan condiciones muy amplias que se consideran generalizaciones obvias a partir de los métodos descritos en D2 a D4 y, por tanto, se considera que dichas reivindicaciones (1 a 14) carecen de actividad inventiva.

Con objeto de subsanar los problemas de novedad y actividad inventiva, se debería redactar un nuevo juego de reivindicaciones. En ellas, el procedimiento se debería restringir a la invención que realmente se ha desarrollado. El nuevo juego de reivindicaciones deberían incluir únicamente las especies y condiciones en las que sea probable que el método funcione, ya que el procedimiento debe ser válido en todo el rango reivindicado. En ese sentido, un procedimiento que ha sido ensayado con una única especie de cefalópodo no permite generalizar a todos los cefalópodos. De la misma manera, las generalizaciones de las condiciones del procedimiento (temperaturas, tiempos, tasa de enfriamiento, etc.) deben ajustarse a lo experimentado.

Por otro lado, las reivindicaciones deben contener todas las características **esenciales** necesarias para que el procedimiento sea efectivo. Según la descripción, únicamente algunas condiciones del ejemplo 2, permiten obtener una proporción de espermatozoides viables aceptable.