

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 256**

21 Número de solicitud: 201290012

51 Int. Cl.:

C12N 5/076 (2010.01)

A01K 67/033 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.08.2010

30 Prioridad:

04.09.2009 CL 1814-2009

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.01.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DEL NORTE (100.0%)
610, Avenida Angamos
Antofagasta 1270709 CL**

72 Inventor/es:

**DUPRÉ MORAGAN, Enrique Marcelo;
GOLDSTEIN, Merari Simei y
ROJAS ANDRADE, Herman Christian**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **Método de preservación de espermatozoides de abalón para la industria acuícola**

57 Resumen:

La presente invención se relaciona con un método de preservación de espermatozoides de abalones, en particular de abalón verde *Haliotis discus hannai* y rojo *H. rufescens*, que comprende mezclar los espermatozoides con un crioprotectante que comprende propilenglicol, sacarosa y yema de huevo; congelar los espermatozoides con el crioprotectante hasta una temperatura de alrededor de -40°C y almacenarlos en nitrógeno líquido. El método también comprende el descongelamiento de las muestras de espermatozoide.

ES 2 394 256 A1

DESCRIPCIÓN

Método de preservación de espermatozoides de abalón para la industria acuícola.

La presente invención se relaciona con un método de criopreservación de espermatozoides de abalones, en particular de abalón verde *Haliotis discus hannai* y rojo *H. rufescens*. La invención busca optimizar e innovar en alternativas tecnológicas utilizando material genético mejorado. El método de la invención está dirigido en particular a la criopreservación de espermatozoides de abalones provenientes de ejemplares con características altamente valiosas (CAV) para los cultivos de producción comercial.

La técnica permite criopreservar, por largos periodos de tiempo, espermatozoides portadores de genes que expresen determinadas características, tales como tasas de crecimiento, coloración, etc. En los espermatozoides de abalones con CAV se pueden seleccionar caracteres como la mayor motilidad, supervivencia y tasa de fecundación, que aseguran lotes exitosos.

Los protocolos de criopreservación comprenden por una parte la selección de crioprotectores y criopreservantes, la concentración de estos, temperaturas óptimas de transición y tiempos de congelación y descongelación.

La tecnología permite preservar dosis de espermatozoides para realizar fecundaciones en cualquier momento que se requiera, especialmente cuando el número de reproductores son limitantes ya que en general no todos los reproductores inducidos al desove responden. El método de la presente invención facilita el trabajo del cultivo larvario en los hatcheries al independizar la producción del ciclo reproductivo natural de los machos.

Arte Previo

En peces existen más de 200 estudios sobre criopreservación de espermatozoides. Los más relevantes se sintetizan en el trabajo de Rana, K.1995. Cryopreservation of fish spermatozoa, en: *Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Eds. J.G.Day, M.R y McLellan. Vol. 38, pp 151-165.

En Invertebrados marinos se han publicado cerca de 30 estudios de criopreservación de espermatozoides dentro de éstos citamos los siguientes que se refieren específicamente a abalones.

Gwo, J., C.Chen &H, Cheng. 2002. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology*, 58: 1563-1578.

Salinas L., C. Paniagua, A.Jenkins, T. Tiersch. 2005. Cryopreservation of sperm of red abalone. *Journal of Shellfisheries Research* 24(2): 415-420

El trabajo de Salinas et al (2005) es el único que se refiere a una de las especies consideradas en esta patente (abalón rojo). De ambos estudios señalados anteriormente ninguno de ellos ha escalado a un nivel productivo, siendo los resultados aplicables sólo a pequeñas escalas. Este punto es de vital importancia, ya que el desarrollo de un método de criopreservación a escala productiva, requiere de una mayor investigación y desarrollo de los resultados obtenidos en la etapa de laboratorio, y en general, varias etapas del método desarrollado a nivel de laboratorio requieren de un ajuste no trivial para ser aplicables a nivel industrial. Además, Salinas et al (2005) evalúan las propiedades de los crioprotectantes: dimetil sulfóxido (DMSO), propilenglicol (PG) y glicerol sin ningún aditivo (como yema de huevo). De dicho estudio, sólo coincide el crioprotector propilenglicol con de la presente invención, sin embargo las concentraciones usadas en los crioprotectores tampoco coinciden con la presente invención. El programa de congelamiento que Salinas et al (2005) divulgan tampoco es similar al programa de congelamiento descrito en la presente invención.

Los siguientes estudios, realizados en ostras y ostiones, determinan la movilidad espermática sin distinguir si este movimiento es lento o rápido o cual es su velocidad de desplazamiento. Ninguno de ellos basa la adecuación de las concentraciones y tiempo de equilibrio del crioprotector en parámetros espermáticos antes y después de la congelación-descongelación como la distancia que se desplazan y la velocidad con que se desplazan como lo hace el método de la presente invención.

Faure C., Devauchelle N. & J. Girard. 1994. Ionic factors affecting motility, respiration and fertilization rate of the sperm of the bivalve *Pecten maximus* (L.). *J. Comp. Physiol.*, 164: 444 – 450.

Dong, Q., B. Eudeline, S.K. Allen Jr.& T.R. Tiersch. 2002. Factors affecting sperm motility of tetraploid Pacific oysters, *J. Shellfish Res.*, 21: 719-723.

Dong, Q., B. Eudeline, C. Huang, T.R. Tiersch. 2005b. Standardization of photometric measurement of sperm concentration from diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Aquaculture. Research.*, 36: 86-93.

El método usado más frecuentemente para medir la motilidad, es una evaluación visual directa bajo microscopio con ayuda de una cámara Neubauer.

Dong, Q., Ch. Huang, B. Eudeline, & T. Tiersch. 2005c. Systematic factor optimization for cryopreservation of shipped sperm samples of diploid pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cryobiology*, 51, 176-197.

Existen tres patentes relacionadas con la invención, Patente US N° US6054317, Patente GB N° WO9806255, y Patente GB N° WO9101636. Ninguna de estas patentes tiene relación con abalones de las especies consideradas en el presente estudio.

El resumen titulado "Protocols for *haliotis rufescens* egg cryopreservation and in vitro fertilization, year 2", correspondiente al segundo año de un proyecto estudiantil bajo el programa de "California State Science Fair", publicado en el año 2007 describe la criopreservación de ovocitos de abalón rojo con un crioprotectante que contiene sólo PG en comparación con otro crioprotectante que sólo contiene DMSO. Los resultados que se muestran son bastante limitados en cuanto al tiempo del estudio y de las condiciones de operación, por lo que no puede compararse con la presente invención, aparte de estar dirigido a la conservación de ovocitos.

Y la solicitud de patente WO2007146344A, solicitada en el año 2007 que divulga una composición para preservación criogénica de esperma, que comprende por lo menos un crioprotectante, seleccionado entre azúcar, rafinosa, lactosa, trehalosa, melibiosa, melecitosa, manotriosa, estaquiosa, dextrano, hidroxietil almidón, sucrosa, maltitol, lactitol, glicerol, polialcoholes y otros seleccionado del grupo de polietilenglicol, DMSO, etilen glicol, propilenglicol, polivinil pirrolidona, glicerol y óxido de polietileno; por lo menos un protector de membranas (yema de huevo) y por lo menos un depurador de radicales libres (agente reductor) no combina los agentes crioprotectantes de la manera en que se hace en la presente invención, y donde la combinación de la presente invención ha demostrado ser superior a lo descrito en los ejemplos de la solicitud de patente WO2007146344A.

Lo que señala la patente anteriormente mencionada, es que permite una mejor sobrevivencia espermática sólo de espermatozoides criopreservados de mamíferos (especialmente roedores y bovinos) aun cuando señala que puede ser utilizado en otros animales como felinos, caballares, aves y peces de acuarios, pero en ningún caso es utilizados en invertebrados y menos en invertebrados marinos como lo que propone la presente invención. Los porcentajes obtenidos en vertebrados, según lo que señala la patente mencionada, son mayores a los reportados en la presente invención, sin embargo la composición de las membranas plasmáticas de invertebrados marinos son diferentes de aquellas que presentan los vertebrados. Por lo cual los porcentajes de motilidad y fecundación obtenidos con ambos tipos de espermatozoides criopreservados no son comparables.

La producción de abalones depende en gran medida del material genético de los padres. La reproducción de abalones es engorrosa y requiere, cuando se realiza con métodos naturales, sincronizar a machos y hembras para lograr una fecundación exitosa.

La calidad de los ejemplares obtenidos por medio de la sincronización de los padres no siempre es homogénea y por ende, la calidad de estos abalones tendrá gran variabilidad, llegando incluso a obtener productos que no cumplen con los estándares requeridos en los distintos mercados.

Contar con un stock de esperma seleccionado de padres con características deseables, permite independizar el proceso de fecundación de la sincronización de los padres.

La criopreservación permite además de independizarse de la sincronización de los padres, seleccionar el material biológico de especímenes con características deseables para la producción, como puede ser mayor tamaño, mejor color, etc., es decir, características altamente valiosas (CAV).

El método de la presente invención soluciona el problema de la técnica relativo a la sincronización de machos y hembra abalones, a la vez que permite proveer un stock de material biológico proveniente de especímenes con características altamente valiosas, de manera de asegurar una producción homogénea y de calidad.

En particular, el método de la presente invención proporciona medios para criopreservar espermatozoides de abalones, más preferentemente de dos especies de abalones; abalón verde y abalón rojo, para realizar fecundaciones en una escala industrial. El método de la invención ha optimizado las diferentes etapas propias del proceso.

El método cuenta con 6 etapas principales, que se describen a continuación.

a) Proporcionar espermatozoides a conservar: los gametos de abalón pueden obtenerse de cualquier manera conocida en el arte, en particular, el modo preferido en la presente invención es a través de la inducción de ejemplares con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y Tris 2M, o bien mediante la inducción de los ejemplares por condiciones de oscuridad y desecación; en particular, el método de desove que considera el uso de Tris 2M y H₂O₂ es bien conocido en el arte (Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase DE Morse, H Duncan, N Hooker, y A Morse. *Science* 15 Abril 1977 196: 298-300), una vez obtenidos los espermatozoides por cualquiera de los métodos considerados en el arte, se realiza un conteo de los mismos usando un método de análisis de imágenes y obteniendo al menos dos parámetros de motilidad a fin de mantener un control de calidad;

b) Proporcionar una solución crioprotectante apropiada, en particular, que contenga propilenglicol en una concentración entre 3 y 7 M, sacarosa entre un 3 y 6 % (volumen/volumen) y yema de huevo entre un 8 y 12% (volumen/volumen);

- c) Agregar en una cápsula de Petri un volumen de espermatozoides obtenidos igual al volumen de la solución crioprotectante del punto anterior mezclando suavemente;
- 5 d) Cargar en una pajuela de 0,5 mL un volumen de entre 30 y 80 μL de agua de mar microfiltrada, luego un volumen de entre 30 y 80 μL de aire, luego un volumen de entre 100 y 500 μL de la solución con espermatozoides del punto anterior, luego un volumen de entre 30 y 80 μL de aire, y finalmente un volumen de entre 30 y 80 μL de agua de mar microfiltrada. La pajuela es sellada, usando alcohol polivinílico (PVA). Se utilizó un período de equilibrio de entre 5 y 15 minutos;
- 10 e) Congelar las muestras usando cualquier técnica del arte, de modo preferente una cámara de congelamiento programable, usando una temperatura inicial de entre 5,5°C y 6,5°C, y se bajar la temperatura hasta -5°C usando una tasa de congelación entre -5,5 y -4,5 °C/min; continuar bajando la temperatura hasta entre -38 y -42°C usando una tasa de congelación de entre -17 a -19°C/min, una vez alcanzada la temperatura de entre -38°C y -42°C sumergir en nitrógeno líquido y almacenar en nitrógeno líquido hasta su uso;
- 15 f) Descongelar los espermatozoides para su uso retirando las pajuelas desde el almacenaje en nitrógeno líquido exponiéndola entre 1 y 5 segundos a temperatura ambiente, sumergirlas inmediatamente en un baño termorregulado a una temperatura entre 45 y 55°C por un tiempo de entre 5 y 10 segundos, depositar el contenido de la pajuela en un recipiente apropiado y agregar entre 0,5 y 1,0 mL de agua de mar microfiltrada para detener el efecto crioprotector.

- En todos los pasos del método en que está involucrada el agua de mar, debe entenderse que el agua de mar está en condiciones estériles usando cualquier método del estado del arte para obtener dicha condición, como por ejemplo usando membranas de microfiltración de 0,22 μm , o posteriormente usando luz ultravioleta.
- 20 Los hatcheries productores de abalón realizan fecundaciones utilizando reproductores acondicionados, los que son inducidos al desove. Los resultados dependen de ciclo reproductivo y del acondicionamiento de los reproductores.

Las ventajas que tiene esta invención es poder tener los espermatozoides almacenados, con un aseguramiento de calidad que permitan realizar desoves planificados de acuerdo a la demanda, y donde los espermatozoides almacenados provienen de especímenes con características altamente valoradas.

25 EJEMPLOS DE APLICACIÓN

Ejemplo 1: Preservación de espermatozoides de Abalón rojo, *Haliotis rufescens*

- a) Obtención de espermatozoides
- 30 Los gametos de abalón fueron obtenidos mediante la inducción a la liberación gamética de ejemplares maduros. La inducción de los ejemplares se llevó a cabo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y Tris 2M, tal como es conocido en el arte (Hydrogen peroxide induces spawning in mollusks, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase DE Morse, H Duncan, N Hooker, y A Morse. Science 15 Abril 1977 196: 298-300)
- b) Solución Crioprotectante y su concentración
- Se utilizó la siguiente solución crioprotectante:
- Propilenglicol (PG 6M), 5% sacarosa (p/v), 10% de yema de huevo (v/v).
- 35 Una vez preparada la solución se procedió a centrifugar a 1.000 rpm durante 10 minutos, luego se separó el sobrenadante y se almacenó a 6°C hasta su posterior uso.
- c) Mezcla de espermatozoides con solución crioprotectante
- 40 En una cápsula Petri, se colocaron 2 mL de los espermatozoides obtenidos y se les agregó 2mL de la solución crioprotectante, obteniéndose así una molaridad de 3M en cada muestra. Una vez puestos los espermatozoides en la cápsula de Petri en contacto con el crioprotector, se procedió al llenado de pajuelas (0,5mL) previamente rotuladas según el crioprotector y la molaridad correspondiente. Esta mezcla se mantiene durante 10min. (Tiempo de equilibrio) antes de iniciar la congelación.
- d) Modo de cargar pajuelas con solución de espermatozoides-crioprotectante
- Las pajuelas se llenaron con ayuda de una micropipeta automática según el siguiente procedimiento:
- 45 1° Se succiona agua de mar (0,05mL aprox.)
- 2° Se succiona la misma cantidad de aire (0,05mL aprox.)
- 3° Se succiona la solución espermática (0,3mL aprox.)
- 4° Se repite el paso 2 y posteriormente el 1

5° Finalmente se sella la pajuela con polivinil-alcohol (PVA)

e) Congelamiento de las muestras

Las pajuelas debidamente rotuladas fueron introducidas en una cámara de criopreservación Marca Planner Modelo Kryo 560-16. Una vez cargada la cámara, se hizo correr el programa correspondiente hasta llegar a la temperatura de -40°C . El programa de congelación usado fue el que se detalla a continuación:

1.- Temperatura inicial: 6°C

2.- Desde 6°C hasta -5°C a una tasa de $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3.- Desde -5°C hasta -40°C a una tasa de $-18^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4.- Se mantienen las pajuelas durante 5 min en esas condiciones

5.- Se extraen las pajuelas y se sumergen en nitrógeno líquido

Después de sumergirlas en nitrógeno líquido, se procedió al almacenamiento en un termo marca MVE modelo XC 32-8 (Fig. 3). Las muestras se mantuvieron a -196°C hasta su descongelación.

f) Descongelamiento

Se descongeló cada pajuela exponiéndola por 3 seg. a temperatura ambiente, luego fueron sumergidas en un baño termorregulado a 50°C por 7 segundos. Después se cortaron ambos extremos de la pajuela para liberar su contenido y depositarlo en una cápsula Petri, donde se adicionó 0,2 mL de agua de mar microfiltrada y se mantuvieron por 5 minutos con la finalidad de detener el efecto del crioprotector y permitir la activación de los espermatozoides.

Ejemplo 2: Fecundación con espermatozoides criopreservados

Antes del inicio del proceso de criopreservación, los ovocitos frescos obtenidos por desove fueron inseminados con espermatozoides frescos para determinar el porcentaje de fecundación control. Para esta determinación en un vaso precipitado se mezcló 50mL de ovocitos con 3mL de espermatozoides frescos.

Para establecer los porcentajes de fecundación con espermatozoides congelados-descongelados se utilizaron cápsulas Petri de 3,5 cm de diámetro con 2mL de ovocitos frescos, agitándose por 2 minutos.

Tanto para la fecundación control como la experimental, después de 15 minutos post-inseminados, los ovocitos fecundados fueron colocados en cristalizadores de 95 mm de diámetro con 100 mL de agua de mar microfiltrada, la cual se cambió después de 15-20 minutos. Se dejan desarrollándose hasta el estado larva veliger y se determina el porcentaje de larvas obtenidas con los espermatozoides criopreservados.

Evaluación visual directa al microscopio

El conteo se realizó en cuatro cuadrantes de forma diagonal en la cámara de Neubauer, verificando además el movimiento de los espermatozoides. Los datos fueron registrados y transformados a porcentaje.

Evaluación mediante el análisis de imágenes

Una vez montada la muestra en el microscopio, se grabaron 4 videos de 5 segundos cada uno, que correspondían a un cuadrante de evaluación del protocolo de conteo en la cámara Neubauer anteriormente descrito.

Los videos fueron tomados con una cámara digital (Canon PowerShot A620) y guardados en formato digital para su posterior análisis mediante un software de análisis de imágenes. Con este programa se determinó el número de espermatozoides, su velocidad de desplazamiento y la distancia recorrida por segundo.

La fecundación mencionada se realizó, tanto con espermatozoides frescos como con espermatozoides sometidos al método de criopreservación y que fueron mantenidos almacenados por un período de 2 a 10 días. El porcentaje de fecundación alcanzado con espermatozoides frescos varió entre 87 y 97%, mientras que el porcentaje de fecundación utilizando los espermatozoides criopreservados es de $40 \pm 7,2\%$.

Al analizar la fragmentación de ADN usando la técnica de ensayo cometa, se obtuvo un 35% de fragmentación para espermatozoides frescos y un 36 a 40% para los espermatozoides criopreservados.

Ejemplo 3: Preservación de espermatozoides de abalón verde *Haliotis discus hannai*.

En el caso del abalón verde se siguieron los mismos pasos del Ejemplo 1 para abalón rojo, cambiando solamente la concentración de propilenglicol en la solución crioprotectante, donde la concentración fue de 3M.

El porcentaje de fecundación obtenido para abalón verde fue de $24,2 \pm 5\%$.

Ejemplo 4: Evaluación de la motilidad espermática de gametos de abalón rojo, sometidos al método de la presente invención.

Muestras por triplicado de los espermatozoides conservados del Ejemplo 1 y Ejemplo 3 fueron evaluados para determinar la motilidad espermática después de someterlos a la descongelación.

- 5 Para abalón rojo se obtuvo un porcentaje de motilidad espermática promedio de $93 \pm 4\%$ y para abalón verde de $87 \pm 6\%$ y los porcentajes de fecundación con espermatozoides criopreservados de $40 \pm 7,2\%$ en abalón rojo y de $20,2 \pm 5\%$ para abalón verde. Estos resultados demuestran la superioridad del método de la presente invención, frente a métodos o crioprotectantes anteriormente descritos.

REIVINDICACIONES

1. Método para preservación de espermatozoides de abalón, CARACTERIZADO porque comprende los siguientes pasos:
- a. proporcionar espermatozoides de abalón a criopreservar;
 - 5 b. proporcionar una solución crioprotectante que comprende propilenglicol, sacarosa y yema de huevo;
 - c. agregar a un volumen de los espermatozoides de la etapa (a) un volumen igual de la solución crioprotectante del punto anterior mezclando suavemente;
 - 10 d. cargar en una pajuela apropiada con un volumen de entre 30 y 80 μL de agua de mar microfiltrada, luego un volumen de entre 30 y 80 μL de aire, luego un volumen de entre 100 y 500 μL de la solución con espermatozoides del punto anterior, luego un volumen de entre 30 y 80 μL de aire, y finalmente un volumen de entre 30 y 80 μL de agua de mar microfiltrada, la pajuela es sellada, y se deja un período de equilibrio de entre 5 y 15 minutos;
 - e. congelar las muestras hasta una temperatura de -40°C y almacenarlas en nitrógeno líquido;
 - f. descongelar los espermatozoides para su uso retirando las pajuelas desde el almacenaje en nitrógeno líquido.
2. Método para preservación de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la solución crioprotectante comprende entre 3 y 7 M de propilenglicol, entre un 3 y 6 % en peso/volumen de sacarosa, y entre un 8 y 12% en volumen/volumen de yema de huevo.
- 15
3. Método para preservación de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque para la congelación se usa una cámara de congelamiento programable, usando una temperatura inicial de entre $5,5^{\circ}\text{C}$ y $6,5^{\circ}\text{C}$, bajando la temperatura hasta entre $-5,5^{\circ}\text{C}$ y $4,5^{\circ}\text{C}$ usando una tasa de congelación de entre $-5,5$ y $-4,5$ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; continuar bajando la temperatura hasta entre -38 y -42°C usando una tasa de congelación de entre -17 a $-19^{\circ}\text{C}/\text{min}$, una vez alcanzada la temperatura de entre -38°C y -42°C sumergir en nitrógeno líquido y almacenar en nitrógeno líquido hasta su uso.
- 20
4. Método para preservación de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque para el descongelamiento la pajuela se expone entre 1 y 5 segundos a temperatura ambiente, se sumergen inmediatamente en un baño termorregulado a una temperatura entre 45 y 55°C por un tiempo de entre 5 y 10 segundos, depositar el contenido de la pajuela en un recipiente apropiado y agregar entre 10 y 40 μL de agua de mar microfiltrada para detener el efecto crioprotector.
- 25
5. Método de preservación de las reivindicaciones 1 a 4, CARACTERIZADO porque el abalón es *Haliotis rufescens*.
6. Método de preservación de las reivindicaciones 1 a 4, CARACTERIZADO porque el abalón es *Haliotis discus hannai*.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201290012

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.08.2010

③② Fecha de prioridad: **04-09-2009**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N5/076** (2010.01)
A01K67/033 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DE LEEUW FE, et al. Effect of Various Cryoprotective Agents and Membrane-Stabilizing Compounds on Bull Sperm Membrane Integrity after Cooling and Freezing. Cryobiology. 1993. Vol. 30(1), pp. 32-44, resumen.	1-6
A	SALINAS-FLORES L. et al. Cryopreservation of Sperm of Red Abalone (<i>Haliotis rufescens</i>). The Journal of Shellfish Research 2005. Vol 24(2), pp. 415-420, página 415, columna 2.	1-6
A	GWO J-C, et al. Semen cryopreservation of small abalone Theriogenology. 2002. Vol 58(8), pp. 1563-1578, resumen.	1-6

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
12.12.2012

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

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

C12N, A01K

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, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.12.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO

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	DE LEEUW FE, et al. Cryobiology. 1993. Vol. 30(1), pp. 32-44.	1993
D02	SALINAS-FLORES L. et al. The Journal of Shellfish Research. 2005. Vol 24(2), pp. 415-420.	2005
D03	GWO J-C, et al. Theriogenology. 2002. Vol 58(8), pp. 1563-1578.	2002

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 presente invención divulga un método para criopreservar espermatozoides de abalones, preferentemente del abalón rojo (*H. rufescens*) y del verde (*Haliotis discus hannai*). Este método se basa en la obtención de los espermatozoides a conservar y su mezcla, a volúmenes iguales, con una solución crioprotectora que contiene propilénglicol (3-7M), sacarosa (3-6 % p/v) y yema de huevo (8-12 % v/v). La mezcla se carga en una pajueta que se somete a congelación siguiendo un programa determinado de tiempos y temperaturas hasta llegar a los -40°C, y se almacena, hasta su uso, en nitrógeno líquido (reivindicaciones 1-6).

El documento D01 se refiere a un estudio para mejorar la tasa de supervivencia de los espermatozoides procedentes del toro después de una congelación y descongelación utilizando diferentes agentes criofilizantes y estabilizantes de membrana a distintas concentraciones. Entre otros, los agentes criofilizantes utilizados son 1,2-propanodiol (6%), sacarosa y yema de huevo (ver resumen).

El documento D02, hace igualmente un estudio de la criopreservación del esperma del abalón rojo (*Haliotis rufescens*). En particular evalúa: a) el efecto tóxico agudo de la concentración de tres criopreservantes, dimetilsulfóxido (DMSO), propilénglicol (PG) y glicerol (GLY) en la motilidad del esperma; b) el efecto de las tasas de enfriamiento y c) la calidad del esperma descongelado mediante la estimación del porcentaje de motilidad, integridad de la membrana y tasa de fertilización (ver página 415, columna 2).

El documento D03 divulga métodos de criopreservación de espermatozoides de un pequeño abalón (*Haliotis diversicolor supertexta*) para maximizar la tasa de fertilización. Para ello evalúa el efecto de ocho crioprotectores ensayados a diferentes concentraciones entre 5 y 25% sobre la motilidad de los espermatozoides expuestos durante hasta 60 minutos a 25°C antes de la congelación. Estos ocho crioprotectores son dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), etilénglicol (EG), propilénglicol (PG), butilénglicol (BG), polietilénglicol, glicerol y metanol (ver resumen).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**1.1 REIVINDICACIONES 1-6**

D01 es el documento del estado de la técnica más cercano al objeto técnico de la presente invención ya que anticipa el uso de los mismos agentes crioprotectores que los reivindicados en ella. Sin embargo, el documento D01 no hace referencia a espermatozoides de abalón (*Haliotis*), ni de otros gasterópodos, sino al esperma de toro. Además, las concentraciones utilizadas de estos agentes tampoco coinciden con las empleadas en la presente solicitud.

Aunque el documento D02 sí anticipa la criopreservación de esperma del abalón rojo (*Haliotis rufescens*), sin embargo este documento solamente anticipa el uso de uno de los componentes, propilénglicol (PG), de la solución crioprotectora reivindicada en la presente solicitud.

Por otra parte, el documento D03 anticipa unos métodos de criopreservación y aumento de la tasa de fertilización de la especie *Haliotis diversicolor supertexta*, así como el uso de propilénglicol (PG) como componente de la solución crioprotectora pero, además de referirse a una especie distinta de las especies reivindicadas en la presente solicitud, tampoco este documento anticipa una composición igual a la reivindicada.

En base a lo expuesto, se concluye que el objeto de las reivindicaciones 1-6 no se encuentra en el estado de la técnica y no podría haber sido deducido del mismo por un experto en la materia a partir de lo divulgado en los documentos D01-D03. Ninguno de estos documentos, tomados independientemente o en combinación, anticipa el empleo del método de preservación de espermatozoides del abalón reivindicado.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-6 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).