

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 142**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2006 E 06821517 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 1981336**

54 Título: **Aumento de la viabilidad y tolerancia de estrés de material biológico viable**

30 Prioridad:

22.11.2005 HU 0501079

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.09.2014

73 Titular/es:

**APPLIED CELL TECHNOLOGY KORLÁTOLT
FELELOSSÉGU TÁRSASÁG (100.0%)**

**Budai út 260. fszt. 3.
8000 Székesfehérvár, HU**

72 Inventor/es:

**HORVÁTH, ANDRÁS;
PRIBENSZKY, CSABA y
MOLNÁR, MIKLÓS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 500 142 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

Aumento de la viabilidad y tolerancia de estrés de material biológico viable

La presente invención se refiere al uso de la presión hidrostática para mejorar la viabilidad de material biológico viable no destinado a la criopreservación, en el que dicho material biológico es un oocito de un animal vertebrado, con la condición de que dicho material biológico viable no es humano.

Antecedentes de la técnica

Los mecanismos fisiológicos mediante los cuales los microorganismos se adaptan a estreses subletales aún no se comprenden bien. Recientes estudios indican que las inestabilidades provocadas por un choque por frío subletal en la síntesis normal de proteínas en bacterias son superadas por la síntesis de las llamadas proteínas de choque por frío (CSP) (Phadtare *et al.*, 1999). Se sospecha que estas CSP tienen muchas funciones, tales como chaperonas de ARN (Graumann y Marahiel, 1999) o activadores de la transcripción (LaTena *et al.*, 1991); se supone que también desempeñan un papel en la protección frente a la congelación (Wouters *et al.*, 1999). Otras investigaciones han descubierto que la producción de CSP es inducida no solo por un choque por frío, sino también por otros estreses ambientales. En *Escherichia coli*, por ejemplo, se produce un tipo de CSP por estrés nutricional (Yamanaka *et al.*, 1998).

Otro ensayo ha demostrado que un tratamiento con alta presión hidrostática provoca la producción de ciertas proteínas inducidas por frío y proteínas de choque térmico (Welch *et al.*, 1993). Puesto que ambos tratamientos de choque por frío y de alta presión aumentan los niveles de CSP, se han realizado ensayos acerca de la posibilidad de protección cruzada. Wemekamp-Kamphuis *et al.* (2002) han descubierto que el nivel de supervivencia después de una presurización de *Listeria monocytogenes* tras un choque por frío es 100 veces mayor que el de células cultivadas a 37 °C.

Una presión hidrostática en el intervalo de 30-50 MPa habitualmente inhibe el crecimiento de diversos organismos: el inicio de la replicación del ADN es uno de los procesos intracelulares más sensibles a la presión (Abe *et al.*, 1999). Los efectos varían en gravedad dependiendo de la magnitud y la duración de la compresión (Murakami y Zimmerman, 1973). Se advierte que la membrana celular es un sitio importante de daños por presión (Palou *et al.*, 1997). Un tratamiento con alta presión hidrostática puede alterar la funcionalidad de la membrana, por ejemplo el transporte activo o la permeabilidad pasiva, y por tanto puede perturbar el equilibrio fisicoquímico de la célula (Yager y Chang, 1983; Aldridge y Bruner, 1985; Macdonald, 1987; Schuster y Sleytr, 2002; Routray *et al.*, 2002). La aplicación de presión puede conducir a cambios en la estructura de las proteínas, que incluyen conformaciones parcial o completamente desplegadas. La presión puede provocar la desnaturalización de proteínas (Schmid *et al.*, 1975; Weber y Drickamer, 1983; Jaenicke, 1991; Gross y Jaenicke, 1994; Silva *et al.*, 2001). Informes recientes han indicado que la presión hidrostática potencia la producción de proteínas de choque (Welch *et al.*, 1993; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002).

Los procesos físicos o bioquímicos en condiciones de presión alterada están gobernados por el principio de Le Chatelier: todas las reacciones que están acompañadas por una disminución de volumen se aceleran considerablemente (Murakami y Zimmerman, 1973; Welch *et al.*, 1993; Palou *et al.*, 1997). La acumulación de los efectos de la presión es letal más allá de un cierto nivel: aunque se producen cambios irreversibles en algunas biomoléculas a presiones más altas, a 300 MPa la mayoría de las bacterias y los organismos multicelulares mueren. Sin embargo, los tardígrados (que en su estado activo mueren entre 100 y 200 MPa) pueden sobrevivir hasta a 600 MPa si se encuentran en un estado deshidratado (Seki y Toyoshima, 1998). Una publicación anterior demostró que los sistemas biológicos son capaces de tolerar presiones altas con la condición de que la presión se reduzca lentamente (Johnson *et al.*, 1954). Pribenszky *et al.* (2003, 2004) también exploraron la posibilidad de una retirada gradual de embriones presurizados y descubrieron que la liberación gradual de la presión aumenta significativamente la supervivencia.

Molnar *et al.* (2002) estudiaron la tolerancia a la presión de embriones de ratón. Se emplearon diferentes presiones para definir el límite de tolerancia de los embriones *in vitro*. Los embriones que recibieron diferentes tratamientos de HHP se trasladaron a madres adoptivas para determinar si eran capaces de desarrollarse en crías sanas. Concluyeron que los embriones pueden sobrevivir a una HHP *in vitro* e *in vivo*.

Ferruzza *et al.* (1979) intentaron establecer los niveles de tolerancia frente a un tratamiento con HHP utilizando huevos de ascidias. El estudio solo menciona los efectos perjudiciales de la HHP para los huevos de ascidias, y concluyó que los huevos pueden sobrevivir a la presión en algunas etapas del desarrollo.

Arai (1986) empleó la presión hidrostática para bloquear la extrusión del segundo cuerpo polar y para introducir alotriploidía en huevos de salmón. El estudio concluyó que una HHP puede provocar halotriploidía cuando se hibridan diferentes especies de salmón, y descubrió que una HHP puede mejorar la probabilidad de que se produzcan con éxito acontecimientos de hibridación.

En respuesta a diferentes estímulos de estrés, son inducidos genes de choque térmico para expresar proteínas de choque térmico (HSP). Estudios previos han revelado que la expresión de genes de choque térmico es regulada a

nivel transcripcional y postranscripcional, y que la rápida inducción transcripcional de genes de choque térmico implica la activación del factor de transcripción específico, factor de choque térmico 1 (HSF1). Además, la inducción transcripcional puede variar en intensidad y cinética de una manera dependiente de la señal y del tipo celular. Kaarniranta *et al.* (1998) demostraron que la carga mecánica en forma de presión hidrostática aumenta la expresión de genes de choque térmico en células similares a condrocitos humanos. La respuesta a una HHP continua se caracteriza por unos niveles elevados de ARNm y de proteínas de HSP70, sin la activación de HSF1 y la inducción transcripcional del gen hsp70. La mayor expresión de HSP70 fue mediada a través de la estabilización de moléculas de ARNm de hsp70. De modo interesante, en contraste con la presurización estática, la carga hidrostática cíclica no da como resultado la inducción de genes de choque térmico. Los descubrimientos de Kaarniranta *et al.* (1998) demuestran que la expresión del gen hsp70 es regulada de modo postranscripcional sin la inducción transcripcional en células similares a condrocitos tras la exposición a una alta presión hidrostática continua. Sugirieron que la regulación postranscripcional en forma de la estabilización del ARNm de hsp70 proporciona otro modo de regulación de los genes de choque térmico que es probable que tenga una importancia significativa en ciertas formas de estrés.

Previamente, los presentes inventores descubrieron que un choque subletal, una alta presión hidrostática (HHP), mejora significativamente la supervivencia postcongelación de blastocistos de ratón congelados (Pribenszky *et al.*, 2005a, documento WO2005022996). De modo similar, en la crioconservación de semen, la motilidad media postcongelación fue significativamente superior con un pretratamiento de presión en cada semen bovino presurizado, comparado con muestras congeladas sin presurización previa. El resultado claramente describe el efecto beneficioso de un tratamiento previo con presión para la motilidad postcongelación de semen de toro crioconservado (Pribenszky *et al.*, 2005b). Otras investigaciones que exploran el entorno biológico y el cambio bioquímico durante el proceso de la HHP revelarán el mecanismo de sus efectos protectores. Sin embargo, estos estudios implican la crioconservación del material biológico después del pretratamiento con HHP, que claramente no es posible, o de una baja eficacia con una diversidad de material biológico.

El proceso de enfriamiento o conservación del semen a unas temperaturas mayores que 0 °C está bien establecido para conservar espermatozoides durante un corto periodo de tiempo (Hackett, *et al.*, 1982; Pinto, 1999; O'Shea *et al.*, 1964). Con un tratamiento (dilución) óptimo del semen y una conservación a unas temperaturas óptimas, el semen puede inseminarse con resultados de fertilidad aceptables (pero, obviamente, con unas tasas de concepción reducidas comparadas con la inseminación con semen fresco) a los 1-2 días después de la recolección (Gill *et al.*, 1970; Goodman y Cain, 1993; Harrop, 1954; Ijaz y Ducharme, 1995; Katila *et al.*, 1997). Estos métodos siguen unas etapas básicas muy similares:

1. Recolección del semen.
2. Dilución del semen a temperatura corporal.
3. Centrifugación opcional del semen diluido. Reextensión del semen para ajustarse a la concentración de esperma óptima.
4. Mantenimiento del semen (re)extendido a temperatura ambiente o a 4-5 °C o a cualquier temperatura que esté por encima del punto de congelación de la muestra.
5. Inseminación del semen.

De modo similar a los espermatozoides, que sufren una pérdida de viabilidad durante la conservación, la capacidad de supervivencia de los embriones o los oocitos también se reduce tras haber sido retirados de su entorno materno fisiológico (por ejemplo, para un cultivo *in vitro*, activación, transferencia de embriones, división, determinación del sexo, biopsia, maduración *in vitro*, ICSI, clonación o cualquier tipo de procedimiento biotecnológico). Por esta razón, la mejora de la viabilidad/capacidad de supervivencia de los gametos y embriones antes o después de cualquier procedimiento, que incluye desde la conservación rutinaria, la inseminación o la transferencia, hasta el procedimiento biotecnológico más complejo, es de gran importancia científica y económica.

De forma similar, por ejemplo, durante la conservación de microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo, liofilización), la viabilidad de los microorganismo se ve muy comprometida. La mejora en la eficacia de cualquier proceso que venga acompañada con una viabilidad mejorada tiene una inmensa importancia científica y económica.

Como resulta evidente por lo anterior, en la técnica sigue siendo necesario mejorar la viabilidad del material biológico que se emplea ampliamente en los protocolos de biotecnología.

Los presentes inventores han descubierto, de modo sorprendente, que mediante la aplicación de una exposición a una presión hidrostática puede mejorarse significativamente la viabilidad de materiales biológicos viables, siendo el material biológico viable un oocito de un animal vertebrado.

También resultó sorprendente que las mejoras fueron sustanciales, incluso cuando se evita aplicar temperaturas por debajo del punto de congelación del medio durante cualquier etapa de la conservación y/o manipulación del material biológico viable. Este descubrimiento tiene implicaciones prácticas significativas para la utilización de los presentes métodos de HHP y otros métodos similares.

Descripción de la invención

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un uso según se define en la reivindicación 1.

La presión utilizada según la invención está en el intervalo de 10 a 100 MPa, más preferiblemente de 20 a 75 MPa, y lo más preferiblemente de 30 a 60 MPa.

5 La presión hidrostática utilizada según la invención se aplica durante un periodo de tiempo entre 10 segundos a 150 minutos, más preferiblemente de 20 segundos a 90 minutos, y lo más preferiblemente de 30 segundos a 60 minutos.

En algunas realizaciones, el periodo de tiempo para liberar la presión es de entre 10 segundos y 2 horas, o entre 1 min y 1 hora, o en otros casos 10 min y 30 min. La liberación de la presión puede ser instantánea.

10 En una realización preferida, la invención se refiere a un uso, en el que la presión se aplica, se mantiene y se libera según un perfil de presión predeterminado.

En otra realización preferida, la invención se refiere a un uso en el que la presión se aplica, se mantiene y se libera según un perfil de temperatura predeterminado.

15 Las realizaciones preferidas se refieren a un uso en el que dicho animal vertebrado es un pez, un ave o un mamífero, preferiblemente bovino, equino, caprino, ovino, porcino, otro tipo de ganado, mascotas, primates, excluyendo los seres humanos.

La presente invención también se refiere a cualquier uso según se describe en la reivindicación 1, en el que el uso de dicho material biológico incorpora cualquier técnica o protocolo que sea aplicable en el campo de las técnicas de reproducción asistida, y las manipulaciones biotécnicas y/o biotecnológicas.

20 En el contexto de la presente descripción, la expresión "material biológico viable" se refiere en general a una parte de un organismo vivo, o a un parte que surge de un organismo vivo, que tiene capacidad para vivir, desarrollarse o germinar bajo condiciones favorables.

25 Los expertos en la técnica apreciarán que el tratamiento con presión según la presente invención puede realizarse según cualquier perfil de presión deseado. Por tanto, la dependencia del tiempo de la presión según se aplica, se mantiene y se libera puede variar dependiendo de diferentes curvas de tiempo-presión, que incluyen todos los momentos del tiempo del tratamiento con presión, es decir, durante la aplicación de la presión, durante el desarrollo del periodo de presión máxima, y durante la fase de liberación de la presión. Resulta obvio que el nivel de presión en cualquier momento del tiempo concreto puede optimizarse y ajustarse según experimentos preliminares que se realizan con facilidad basándose en las presentes indicaciones sin un exceso de experimentación.

30 En otra realización preferida, el método de la presente invención puede realizarse según un perfil de temperatura predeterminado. La expresión "perfil de temperatura" se refiere al perfil de tiempo-temperatura según se mide o se ajusta durante el desarrollo del tratamiento con presión, y puede controlarse independientemente de la presión aplicada. En realizaciones preferidas, aunque el tratamiento con presión se realice a una única temperatura, el material biológico de interés puede dictar el uso de diferentes temperaturas en diferentes etapas o partes de las etapas del tratamiento con presión. Una temperatura ajustada puede ser cualquier temperatura, por ejemplo, la temperatura ambiente, la temperatura ambiental, la temperatura nativa del cuerpo del cual se origina el material biológico, una temperatura ligeramente elevada de dicha temperatura nativa del cuerpo, y similares. Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad la aplicabilidad de cualquier perfil de temperatura concreto analizando la eficacia del tratamiento con presión comparado con experimentos control.

40 Sin estar limitados por la teoría, una posible explicación de esta característica puede ser que se genera una cantidad considerable de CO₂ bajo presión (Abe y Horikoshi, 1995). La hidratación e ionización del CO₂ (HCO₃⁻ y H⁺) se ven facilitadas por una presión elevada porque la reacción viene acompañada de una disminución en el volumen (-0,26 ml/mol) de una manera dependiente de la magnitud de la presión aplicada (Palou *et al.*, 1997; Welch *et al.*, 1993). El dióxido de carbono producido de modo intracelular se disuelve instantáneamente, y después se disocia para producir HCO₃⁻ y H⁺, reduciendo así el pH intracelular (Abe y Horikoshi, 1995, 1997, 1998; Abe *et al.*, 1999). En una condición de un cierto tiempo de descompresión, las proteínas de la membrana plasmática (H⁺-ATPasa) (Schmid *et al.* 1975; Péqueux y Gilles, 1978) inactivadas de modo reversible por una presión hidrostática elevada, comienzan a funcionar de nuevo, desplazando (junto con la difusión pasiva) el equilibrio gradualmente hacia el estado fisiológico.

50 Se presurizaron oocitos de cerdo para estudiar su tolerancia a la presión. Después, con parámetros cuidadosamente seleccionados, los oocitos se pretrataron, se sometieron a un estrés con un impulso eléctrico 10 veces mayor que el valor óptimo, y se estudiaron para determinar la división y el posterior desarrollo hasta la etapa de blastocisto. El número de oocitos activados *in vitro* que se dividieron y posteriormente se desarrollaron fue mayor con un tratamiento con presión que en ausencia de este.

Los siguientes ejemplos y ejemplos de referencia demuestran la mejora en la viabilidad/capacidad de supervivencia de material biológico por una exposición a una presión hidrostática utilizando blastocistos de ratón, oocitos de cerdo,

espermatozoides de cerdo y toro, y dos especies de bacterias como sistemas modelo. Esto puede evaluarse trasladando los embriones presurizados, después de su tratamiento, a un medio cultivo y/o hacia receptores de pseudoembarazo; o una activación *in vitro*; o inseminando el semen tratado; o contando la supervivencia de las bacterias después de la liofilización, respectivamente. El desarrollo *in vitro*, la implantación y el posterior desarrollo uterino y la división y el posterior desarrollo son pruebas obvias de la viabilidad de los embriones y los oocitos.

La presurización puede realizarse utilizando cualquier dispositivo de presurización disponible que pueda adaptarse a los protocolos según la presente invención. Los ejemplos no limitantes de dichos instrumentos son, por ejemplo, los dispositivos descritos en el documento WO2005022996 o en el presente documento.

Ejemplo de referencia 1: Supervivencia de embriones de ratón a diferentes presiones a temperatura ambiente, y efecto del tratamiento con presión sobre la implantación y las tasas de nacimiento

Producción y cultivo de embriones

Se recolectaron embriones de ratón en la etapa de una sola célula de donantes CB6F1 de 6-8 semanas superovuladas y se cultivaron a 37 °C con CO₂ al 2% y una máxima humedad en el aire en medios G 1.2 y G 2.2 (Vitrolife, Göteborg) hasta la etapa de blastocisto expandido.

Presurización

Los blastocistos se cargaron sobre pajillas de plástico de 0,08 ml (7-9 embriones/pajilla) con M2 (Sigma, St. Louis, MO). Las pajillas, rellenas con M2 como medio de presión, se colocaron en la cámara de un dispositivo especial fabricado a medida que es capaz de generar y detectar con precisión una presión hidrostática de hasta 150 MPa. Se obtuvo la cantidad de presión deseada tras 20 segundos a 5 minutos (de 10 MPa a 150 MPa, respectivamente); la duración de la liberación de la presión fue de 2-4 segundos.

Transferencia

Para la evaluación *in vivo*, los embriones presurizados con 600 bares durante 30 min se cultivaron en G 2.2 durante 2 horas como se indicó anteriormente. Después se transfirieron (7-12 embriones por animal) a receptores de pseudoembarazo del día 3. Se transfirieron blastocistos no tratados como controles.

Evaluación y análisis estadístico

Se extrajeron conclusiones de los cambios en el aspecto morfológico de embriones examinados con un aumento de 400 x durante 24 horas de cultivo *in vitro* continuo, y de la tasa de nacimientos de los embriones transferidos. Una morfología microscópicamente inalterada de los blastómeros, la reexpansión del blastocele y la eclosión de la zona pelúcida son señales de la supervivencia *in vitro*. El número de fetos en la disección del día 18 de las hembras preñadas o el nacimiento de crías sanas es una prueba de la supervivencia *in vivo* de los embriones. Las tasas de supervivencia se compararon con los controles mediante un ensayo de chi-cuadrado.

En los presentes experimentos, los embriones se expusieron a diferentes presiones hidrostáticas de 10 a 150 MPa (en incrementos de 10 MPa) durante diversos intervalos de tiempo, entre 1 seg a 300 min, a temperatura ambiente.

El tratamiento que excede una cierta cantidad de presión y tiempo provoca cambios morfológicos reversibles. Los blastocistos expandidos se compactaron dentro de la zona pelúcida: el blastocele desapareció, el tamaño de los blastómeros se redujo, pero no mostraron alteración en su integridad estructural. Después de 4-5 horas de cultivo *in vitro*, estos blastocistos se reexpandieron y eclosionaron de la zona pelúcida en 24 horas (a). Los embriones que recibieron menos impacto no mostraron cambios morfológicos y eclosionaron a las 24 horas de cultivo *in vitro* (b), mientras que los embriones expuestos a un impacto mayor no se reexpandieron desde el estado compactado y se desintegraron a las 2 horas, o ya estaban desintegrados después de la descompresión (b).

Para la evaluación *in vivo*, los embriones expuestos se consideraron "supervivientes" (a y b), y "muertos" (c) después de 2 horas de cultivo *in vitro* después de la descompresión, y se trasladaron a diferentes receptores. Se transfirieron 29 embriones tratados con presión a madres pseudopreñadas, de los cuales nacieron 28. Esta tasa es mayor que la que se logra con embriones no tratados. La mejora significativa frente a los datos de la técnica anterior (aproximadamente 85%) también demuestra la solidez del pretratamiento con presión. Cuando se aplican los parámetros óptimos de presión y tiempo, la mejora en la viabilidad del material biológico aún puede ser significativa, a pesar de que los valores de la línea de base son bastante altos y ya son considerados satisfactorios por la industria. Sin embargo, en el campo de las ART, cada punto de porcentaje puede tener una importancia económica añadida.

Ejemplo de referencia 2: Supervivencia de espermatozoides de toro a diferentes presiones a temperatura ambiente, y efecto del tratamiento con presión sobre la prevención de la disminución de la motilidad espermática

Aunque el semen de toro habitualmente se conserva congelado, también se ensayó la viabilidad del presente

método en un sistema importante desde el punto de vista industrial.

5 Se diluyó el semen de 13 toros hasta una concentración espermática de 8×10^7 /ml con un extensor AndroMed (MiniTüb, Tiefenbach, Alemania). El esperma diluido se cargó sobre pajillas de 0,25 ml a 25 °C. Las pajillas se dividieron en grupos de tratamiento y un grupo control no tratado. Los grupos de tratamiento se presurizaron con una máquina de presión controlada por ordenador (Cryo-Innovation, Budapest, Hungría) con 9 perfiles diferentes. Para el ensayo de la motilidad total/progresiva se empleó un aparato CASA, SpermVision versión 3.0 (Minitüb, Tiefenbach, Alemania).

10 Se concluyó que un tratamiento con presión por debajo de la región de 600 bares no afecta de modo negativo a la supervivencia del esperma. Después de 8 horas de conservación del semen a temperatura ambiente se volvió a analizar la motilidad de las muestras tratadas/no tratadas: la proporción de células móviles fue mayor en las muestras tratadas.

Ejemplo de referencia 3: Supervivencia de espermatozoides de cerdo a diferentes presiones a temperatura ambiente, y efecto del tratamiento con presión sobre la prevención de la disminución de la motilidad espermática

15 Para estudiar más a fondo la aplicabilidad del método según la invención se estudió la supervivencia de espermatozoides de cerdo, para los cuales la conservación a temperatura ambiente es una práctica habitual en la industria.

Recolección de semen

20 El semen se recogió de los cerdos dos veces cada semana. La fracción rica en esperma filtrada se recogió mediante la técnica de la mano enguantada y se introdujo en una botella de vacío aislada de 250 ml, en la cual se evaluó el esperma (Hancock y Hovell, 1959). Se emplearon las fracciones ricas en esperma de las eyaculaciones con más del 70% del esperma móvil.

Preparación del semen

25 La preparación del semen congelado se realizó siguiendo un método previamente descrito (Almlid y Johnson, 1988; Maxwell y Johnson, 1997) con pequeñas modificaciones. Brevemente, el semen se diluyó 1:2 con extensor de disolución de descongelación Beltsville (BTS) a 37 °C en la botella aislada y después se enfrió a temperatura ambiente (20-23 °C) durante 1 h después de la recolección. Después de enfriar, el semen se trasladó a tubos de 10 ml, se centrifugó a temperatura ambiente durante 3 min a 2400 x g, y se rechazó la disolución de sobrenadante. Los sedimentos se resuspendieron en lactosa y diluyente de yema de huevo a temperatura ambiente. Después se añadió un diluyente de glicerol (el segundo diluyente) y pasta Equex ((Minitüb, Tiefenbach, Alemania) al semen para obtener una concentración final de 6% de glicerol y 0,5% de Equex. Después se rellenaron minipajillas de 0,25 ml (IMV, L'Aigle, Francia) con el semen, y las pajillas se termosellaron. La concentración se ajustó para proporcionar 300 x 10⁶ esperm/ml.

Presurización

35 Las pajillas se colocaron en la cámara de presión, se rellenaron con agua como medio de presión del dispositivo de presurización, y se aplicó el protocolo de presión predeterminado. El dispositivo presurizado fabricado a medida es capaz de proporcionar una presión controlada con precisión en el intervalo de 10-1000 bares. Está fabricado con acero inoxidable (KO 33) con un diámetro interno de 20 x 220 mm, y está conectado a un indicador de presión. Un pistón que se mueve en la cámara de presión genera la presión hidrostática. La velocidad de la presurización y la despresurización fue de 200 bares/min.

40 Las muestras se presurizaron a temperatura ambiente (TA) con 200, 400 o 800 bares durante 40, 80 o 120 minutos. Las muestras no presurizadas se mantuvieron a temperatura ambiente durante el tiempo correspondiente.

Evaluación

45 Después de 20 min de incubación, se trasladaron dos gotas de 5 µl a portaobjetos de vidrio y se aplicaron dos cubreobjetos de 22 mm x 22 mm. Las muestras se insertaron en el microscopio (Olympus BX 30), equipado con una óptica de contraste fase y una plataforma de microscopio a 37 °C (20X, Olympus, Japón) y se evaluaron 5-5 campos de cada gota mediante el aparato CASA, SpermVision versión 3.0 (Minitüb, Tiefenbach, Alemania). Los espermatozoides con VSL > 10 µm/s y AOC > 10 se consideraron móviles progresivos.

Resultados

50 Después de analizar los parámetros de motilidad utilizando un modelo mixto (factores: tiempo, presión, fecha (aleatorio)), el factor de presión demostró ser significativo (p = 0,001, motilidad total; p = 0,0103, motilidad progresiva). Después de múltiples comparaciones de los tratamientos con presión, el impacto de un tratamiento de 800 bares demostró ser significativamente peor (P < 0,001, motilidad total; P < 0,05, motilidad progresiva) que los

otros niveles (tabla 1).

Tabla 1: Parámetros de motilidad (motilidad media (error estándar)) después de diferentes tratamientos con presión

	40 min		80 min		120 min	
	mt	mp	mt	mp	mt	mp
200 bares	81 (4)	71,5 (6,5)	91 (2)	61 (16)	82,5 (0,5)	64 (16)
400 bares	87 (3)	73 (2)	87 (2)	52 (9)	80 (4)	63 (9)
800 bares	65,5 (6,5)	48 (2)	78,5 (3,5)	53,5 (9,5)	69,5 (3,5)	52 (10)
Presión atmosférica	88 (2)	70 (11)	88 (1)	61 (10)	80 (1)	68,5 (8,5)

mt: motilidad total; mp: motilidad progresiva. Se realizaron 2 repeticiones de cada combinación de tratamiento.

- 5 Después se estudió si la aplicación de un tratamiento con presión afecta a las tasas de motilidad espermática después de 5 horas de tiempo de aclimatación al frío. De nuevo se empleó un modelo mixto con presión, tiempo y examen (con dos niveles: antes y después del tiempo de aclimatación de 5 horas), las interacciones de los factores fijos, y la fecha como factor aleatorio. Solo los factores de presión y examen resultaron significativos (tabla 2).

Tabla 2: Parámetros de motilidad (motilidad media (error estándar)) después de 5 horas de tiempo de aclimatación al frío

	40 min		80 min		120 min	
	mt	mp	mt	mp	mt	mp
200 bares	78,5 (1,66)	51,25 (7,5)	85,67 (2,33)	71,33 (5,46)	80 (2)	56,5 (4,5)
400 bares	77 (1,58)	63,25 (5,76)	78,67 (4,18)	64 (7,77)	80,5 (4,5)	74 (2)
800 bares	67 (4,53)	46,75 (4,5)	64 (0,58)	47,33 (2,19)	76,5 (1,5)	66 (1)
Presión atmosférica	72,25 (2,56)	47,75 (10,59)	78,33 (4,1)	60 (10,21)	75 (4)	45,5 (3,5)

- 10 mt: motilidad total; mp: motilidad progresiva. Se realizaron 4, 3 y 2 repeticiones de cada tratamiento con presión durante intervalos de 40, 80 y 120 minutos, respectivamente.

La motilidad total de las muestras no presurizadas (atm) se redujo significativamente, pero después de los tratamientos de 200 y 400 bares, la motilidad no se redujo después de 5 horas de tiempo de aclimatación al frío, comparado con la motilidad inicial.

- 15 **Ejemplo de referencia 4: Efecto de un tratamiento con presión sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides de cerdo**

Se inseminaron cinco cerdas, que ya habían sido excluidas de la producción, con semen de cerdo tratado con presión para observar la capacidad fertilizante de espermatozoides tratados con presión, así como para investigar cualquier malformación que aparezca en la descendencia.

- 20 Los eyaculados de dos cerdos se extendieron 1:3 con un extensor comercial, a la temperatura corporal, y después las muestras se dejaron enfriar hasta la temperatura ambiente a lo largo de 30 minutos, antes de introducir el semen extendido en bolsas de infusión. Las bolsas de infusión se colocaron en la cámara de presión de un dispositivo de presurización automático (Cryo-Innovation Ltd., Budapest, Hungría) y se ejecutó el programa de presión a temperatura ambiente.

- 25 El tratamiento con presión empleado fue de 300 bares durante 90 minutos. Después del tratamiento, las muestras de semen se volvieron a extender con el mismo extensor comercial a temperatura ambiente, y después se inseminaron 5 cerdas en 1 hora transcurrida desde la presurización. La inseminación se repitió 12 horas después de la primera inseminación con el semen tratado, y se dejó a 5 °C durante el tiempo correspondiente.

- 30 En el examen con ultrasonidos se demostró que las cinco cerdas estaban preñadas. Después de un parto normal nacieron 58 lechones sanos. Los lechones no tenían defectos ni malformaciones.

Se concluyó que el tratamiento con presión aplicado mantiene la capacidad fertilizante de los espermatozoides de

cerdo, y no provoca defectos ni malformaciones en la descendencia. El tamaño medio de la camada en la granja es de 9,8 lechones/cerda, mientras que el tratamiento con presión aplicado produjo una tasa de embarazo del 100% y un tamaño medio de la camada de 11,6. Por tanto, también se concluyó que el tratamiento con presión aplicado también aumenta el tamaño medio de la camada que se puede lograr.

5 Ejemplo 5: Supervivencia (división tras la activación *in vitro*) de oocitos de cerdo después de diferentes tratamientos con presión

Se activaron oocitos de cerdo madurados *in vitro* mediante una electroactivación *in vitro* después de diferentes combinaciones de tratamientos con presión para determinar la tolerancia a la presión de los oocitos.

10 Se dividieron 600 oocitos desnudos madurados *in vitro* en grupos de tratamiento (n = 15-20 oocitos/grupo) y grupos control. Los grupos se presurizaron en pajillas artificiales de 0,5 ml en medio TCM-HEPES (las pajillas se sellaron con aceite mineral y una bola metálica) con 200-400 bares durante 30-90 min a 24 °C y a 38,5 °C. Los controles se mantuvieron en las mismas circunstancias, y un grupo control se dejó en el medio IVM en el termostato durante el tiempo correspondiente. Después de los tratamientos, los oocitos se activaron *in vitro* y se colocaron en medio de cultivo en un termostato a 38,5 °C para su posterior desarrollo. Se comprobó la división 48 horas después de la activación. La tabla 3 muestra el porcentaje de oocitos en los diferentes grupos que se dividieron después de la activación *in vitro*.

Tabla 3: Porcentaje de oocitos que se dividieron después de los tratamientos con presión a 24 °C y a 38,5 °C, 48 h después de la activación *in vitro*

P/t (24 °C)	30 min	60 min	90 min
200 bares	71%	65%	68%
400 bares	85%	86%	74%
Grupo control I:	65%		
P/t (38,5 °C)	30 min	60 min	90 min
200 bares	91%	94%	76%
400 bares	72%	75%	83%
Grupo control II:	90%		
Grupo control III (termostato):	81%		

20 Se concluyó que los tratamientos de 200-400 bares durante 30-90 minutos no eran perjudiciales para los oocitos de cerdo madurados. Además, el tratamiento de 400 bares durante 30-60 minutos a 24 °C y el tratamiento de 200 bares durante 30-60 minutos a 38,5 °C produjeron mayores tasas de división que los correspondientes grupos control. También se realizaron tratamientos con 600-800 bares/30-90 minutos. En estos grupos los oocitos no sobrevivieron a los tratamientos; estos parámetros de presión son perjudiciales.

25 Ejemplo 6: Supervivencia de oocitos de cerdo madurados *in vitro* después de diferentes combinaciones de tratamientos con presión, activados con un pulso eléctrico 10 veces más fuerte que el óptimo

Se activaron oocitos de cerdo madurados *in vitro* mediante una electroactivación de magnitud 10x *in vitro*, después de diferentes combinaciones de tratamientos con presión, para estudiar si los oocitos tratados sobreviven mejor al electrochoque perjudicial.

30 Se dividieron 300-600 oocitos madurados *in vitro* (diario) en grupos de tratamiento (n = 15-20 oocitos/grupo) y grupos control. Los grupos con células del cúmulo se presurizaron en pajillas artificiales de 0,5 ml en medio TCM-HEPES (las pajillas se sellaron con aceite mineral y una bola metálica) con 200-800 bares durante 30-120 min a 24 °C. Los controles se mantuvieron en las mismas circunstancias, y un grupo control se dejó en el medio IVM en el termostato durante el tiempo correspondiente. Después de los tratamientos, los oocitos se desnudaron con agitación en vórtice, se activaron *in vitro* con un impulso eléctrico 10 veces más fuerte que el óptimo, y después se colocaron en medio de cultivo en un termostato a 38,5 °C para su posterior desarrollo. Se comprobó la división 48 horas después de la activación, y la formación de blastocistos se estudió en el 6º día. Los experimentos se repitieron 3 veces.

Tabla 4: Porcentaje de los oocitos en los diferentes grupos que se dividieron y posteriormente se desarrollaron

después de una activación *in vitro* con un pulso eléctrico 10x.

P/t	30 min	60 min	120 min
200 bares	42%	54%	26%
400 bares	35%	35%	29%
600 bares	0%	0%	0%
800 bares	0%	0%	
Control I (24 °C):	20%		
Control II (termostato):	10%		
Formación de blastocistos			
P/t	30 min	60 min	120 min
200 bares	47%	44%	32%
400 bares	29%	35%	28%
600 bares	0%	0%	0%
800 bares	0%	0%	
Control I (24 °C):	28%		
Control II (termostato):	21%		

- 5 Los tratamientos de 200-400 bares durante 30-60 minutos produjeron un número significativamente mayor de oocitos supervivientes que los que no fueron tratados o los tratados con 600 u 800 bares. Se concluyó que los tratamientos con una presión de 200 bares durante 30 o 60 minutos demostraron proporcionar una tasa de división y una tasa de blastocitos significativamente mayores, comparado con el grupo control y otros grupos.

Ejemplo de referencia 7: Supervivencia de bacterias después de diferentes combinaciones de tratamientos con presión, seguidas de una liofilización

- 10 Para el experimento se emplearon dos microbios, *Escherichia coli* y *Lactobacillus plantarum*. Los recuentos celulares se determinaron sobre el medio nutritivo TGE (extracto de glucosa triptona) (MERCK) y agar MRS (MERCK), respectivamente. Los recuentos celulares se determinaron antes de preparar los grupos de tratamiento, después de los tratamientos con presión, y después de 96 horas de incubación a 37 °C después de liofilizar (c.f.u.). Los tratamientos con presión se ejecutaron con 9 máquinas presurizantes al mismo tiempo según la siguiente tabla:

Presión/Tiempo	30 min	60 min	90 min
200 bares	Grupo de tratamiento 1	Grupo de tratamiento 2	Grupo de tratamiento 3
400 bares	Grupo de tratamiento 4	Grupo de tratamiento 5	Grupo de tratamiento 6
600 bares	Grupo de tratamiento 7	Grupo de tratamiento 8	Grupo de tratamiento 9

- 15 Las muestras se introdujeron en pajillas artificiales estériles de 0,5 ml, y se sellaron con una bola de hierro estéril. La liofilización se realizó en un equipo de liofilización Edwards. Los experimentos se reprodujeron dos veces. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

Tabla 5: Número de células vivas de *Lactobacillus plantarum* (c.f.u./0,4 ml) antes y después de liofilizar (dos repeticiones) (recuento inicial de células (c.f.u./ml) antes del tratamiento: $9,0 \times 10^6$ - $1,1 \times 10^7$)

n.º del grupo de tratamiento	Número de células vivas/0,4 ml		
	Antes de liofilizar	Después de liofilizar I	Después de liofilizar II
1	1,30 x 10 ⁷	2,29 x 10 ⁶	2,56 x 10 ⁶
2	7,80 x 10 ⁶	3,02 x 10 ⁶	2,54 x 10 ⁶
3	8,80 x 10 ⁶	2,01 x 10 ⁶	2,05 x 10 ⁶
4	5,70 x 10 ⁶	4,25 x 10 ⁶	4,19 x 10 ⁶
5	6,38 x 10 ⁶	1,99 x 10 ⁶	2,10 x 10 ⁶
6	1,26 x 10 ⁷	4,34 x 10 ⁶	4,13 x 10 ⁶
7	7,50 x 10 ⁶	3,12 x 10 ⁶	3,59 x 10 ⁶
8	8,70 x 10 ⁶	2,71 x 10 ⁶	3,88 x 10 ⁶
9	8,30 x 10 ⁶	3,36 x 10 ⁶	4,83 x 10 ⁶
Control	1,05 x 10 ⁷	2,56 x 10 ⁶	4,08 x 10 ⁶

Tabla 6: Número de células vivas de *Escherichia coli* (c.f.u./0,4 ml) antes y después de liofilizar (dos repeticiones) (recuento inicial de células (c.f.u./ml) antes del tratamiento: 4,08 x 10⁸-4,10 x 10⁸)

n.º del grupo de tratamiento	Número de células vivas/0,4 ml		
	Antes de liofilizar	Después de liofilizar I	Después de liofilizar II
1	6,10 x 10 ⁸	1,55 x 10 ⁷	1,65 x 10 ⁷
2	3,20 x 10 ⁸	2,56 x 10 ⁸	2,90 x 10 ⁸
3	4,80 x 10 ⁸	9,30 x 10 ⁷	9,0 x 10 ⁷
4	3,90 x 10 ⁸	1,36 x 10 ⁸	1,00 x 10 ⁸
5	5,90 x 10 ⁸	2,14 x 10 ⁸	1,80 x 10 ⁸
6	5,95 x 10 ⁸	2,27 x 10 ⁸	1,70 x 10 ⁸
7	6,10 x 10 ⁸	7,50 x 10 ⁷	9,50 x 10 ⁷
8	6,60 x 10 ⁸	1,65 x 10 ⁸	7,80 x 10 ⁷
9	6,20 x 10 ⁸	1,52 x 10 ⁷	1,21 x 10 ⁷
Control	5,10 x 10 ⁸	2,50 x 10 ⁷	7,7 x 10 ⁷

- 5 Los grupos de tratamiento marcados en **negrita** representan una tasa de supervivencia celular significativamente mayor comparada con el grupo control. Entre los grupos de tratamiento, los grupos n.º 2 y n.º 4 demostraron ser superiores. Se concluyó que un tratamiento con una alta presión hidrostática específica antes de liofilizar potencia significativamente la tasa de supervivencia celular después de la liofilización.

10 **Ejemplo de referencia 8: Supervivencia de embriones bovinos después de una biopsia de embriones o determinación del sexo con o sin un tratamiento con presión**

Recolección de oocitos y maduración in vitro (IVM)

Se maduraron COC (aspirados de ovarios de un matadero) en TCM-199 de Earl suplementado con FCS, LH (Sigma), FSH (Sigma), L-glutamina, penicilina y estreptomina, con una cobertura de aceite mineral en 38 °C con CO₂ al 5,1% y una humedad máxima del aire durante 22 horas.

- 15 *Preparación del esperma, fertilización in vitro (IVF) y cultivo in vitro (IVC)*

El medio de fertilización es TALP suplementado con BSA, penicilamina, hipotaurina, epinefrina y heparina cubierto con aceite mineral.

- 5 Se obtuvieron espermatozoides móviles mediante centrifugación de espermatozoides congelados y descongelados en un gradiente de densidad discontinuo de Percoll (2 ml de Percoll al 45% sobre 2 ml de Percoll al 90%) durante 20 min a 700 g a temperatura ambiente. Después de la resuspensión, los espermatozoides se añadieron a las gotas de fertilización. Las placas se incubaron durante 19 hr en CO₂ al 5% en aire humidificado a 39 °C. Después se cultivaron los presuntos cigotos *in vitro* en gotas de SOF bajo aceite mineral en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 39 °C.

Presurización

- 10 Los blastocistos expandidos se cargaron en pajillas de plástico de 0,25 ml sin burbujas de aire (7-9 embriones/pajilla) con medio de mantenimiento de embriones y después las pajillas se sellaron con PVC. Las pajillas se colocaron en el dispositivo presurizante (Cryo-Innovation Ltd., Budapest, Hungría). Los embriones se expusieron a diferentes presiones hidrostáticas de 60 a 90 MPa (en incrementos de 10 MPa) durante diversos tiempos (15, 30, 45, 50, 60, 90, 100 minutos) a temperatura ambiente.

15 *Resultados*

La tasa de supervivencia de los embriones a los que se les ha determinado el sexo o de los embriones después de la biopsia es significativamente mayor con un tratamiento de presión especialmente seleccionado que sin este tratamiento.

20 **Ejemplo de referencia 9: Supervivencia de embriones bovinos después de la transferencia de genes con o sin un tratamiento con presión**

- 25 En el presente experimento se exponen embriones bovinos a una presión hidrostática para descubrir si su comportamiento bajo condiciones de presión alteradas es similar al de los embriones de ratón. Después de la exposición a la presión hidrostática, las muestras se sometieron a una transferencia de genes. Después del cultivo *in vitro* y la transferencia, la supervivencia de las muestras es mayor, comparada con muestras que no habían sido tratadas previamente con presión.

Ejemplo de referencia 10: Supervivencia de embriones humanos después de ICSI y de biopsias de embriones con o sin un tratamiento con presión

- 30 En el presente experimento se exponen embriones bovinos a una presión hidrostática para descubrir si su comportamiento bajo condiciones de presión alteradas es similar al de los embriones de ratón. Después de la exposición a la presión hidrostática, las muestras se sometieron a ICSI o biopsia. Después del cultivo *in vitro* y la transferencia, la supervivencia de las muestras es mayor, comparada con muestras que no habían sido tratadas previamente con presión.

Ejemplo de referencia 11: Supervivencia de oocitos (humanos, bovinos, caprinos, porcinos) después de un tratamiento con presión, conservación y maduración *in vitro*

- 35 El objetivo del presente experimento es demostrar que los oocitos toleran cualquier proceso (incluyendo una conservación/maduración *in vitro*) con una eficacia mucho mayor que si son tratados previamente con presión hidrostática. Los oocitos son tratados con presión hidrostática y las muestras se mantienen *in vitro* después de liberar la presión. La supervivencia *in vitro* e *in vivo* de los oocitos es mayor, comparada con las muestras que no habían sido tratadas previamente con presión.

40 **Ejemplo de referencia 12: Supervivencia de células pluripotenciales embrionarias después de un tratamiento con presión y conservación *in vitro***

- 45 El objetivo del presente experimento es demostrar que la supervivencia de células pluripotenciales embrionarias es mayor con un tratamiento con presión previo. Las células pluripotenciales embrionarias de ratones son tratadas con presión hidrostática y las muestras se conservan y se tratan después de liberar la presión. La supervivencia *in vitro* e *in vivo* de las muestras es mayor, comparada con las muestras que no habían sido tratadas previamente con presión.

Referencias bibliográficas

- Abe, F., y Horikoshi, K. (1995), Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbiol. Lett., 130, 307-312.
- 5 Abe, F., y Horikoshi, K. (1997), Vacuolar acidification in *Saccharomyces cerevisiae* induced by elevated hydrostatic pressure is transient and is mediated by vacuolar H⁺-ATPase, Extremophiles, 1, 89-93.
- Abe, F., y Horikoshi, K. (1998), Analysis of intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under elevated hydrostatic pressure: a study in baro- (piezo-) physiology, Extremophiles, 2, 223-228.
- Abe, F., Kato, C., y Horikoshi, K. (1999), Pressure-regulated metabolism in microorganisms, Trends Microbiol., 7, 447-453.
- 10 Aldridge, B.E., Bruner, L.J. (1985), Pressure effects on mechanisms of charge transport across bilayer membranes, Biochim. Biophys. Acta, 817, 343-354.
- Almlid T., y Johnson L.A., 1988, Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws, J. Anim. Sci., 66:2899-2905.
- 15 Arai, K. (1986), Effecto of allotriploidization on development of the hybrids between female chum salmon *Oncorhynchus keta* and male brook trout *Salvelinus fontinalis*, Nippon Suisan Gakkaishi, 52, 823-830.
- Ferruzza, N.F., Vitturi, R., Zuccarillo, G. y Reverberi, G. (1979), The effect of hydrostatic pressure on the development of ascidian eggs, Acta Embryologiae Experimentalis, 3, 301-312.
- Gill H.P., Kaufman C.F., Foote R.H., Kirk R.W. (1970), Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored, and frozen-stored semen. Am J Vet Res 1970;31:1807-1813.
- 20 Goodman M.F., Cain Jt. (1993), Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog, J. Reprod. Fertil., 1993, 47:554, resumen.
- Graumann, P.L., Marahiel M.A. (1999), Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*, Arch. Microbiol., 171, 135-138.
- 25 Gross M., y Jaenicke R., 1994, Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes, Eur. J. Biochem., 221:617-630.
- Hackett, A.J., Wolynetz, M.S. (1982), Reproductive performance of totally confined sheep bred with semen extended in a lactose-egg yolk-glycerol buffer and stored at 5 degrees C, Canadian Journal Of Comparative Medicine, Revue Canadienne De Medecine Comparee, volumen 46, número 3, julio de 1982, páginas 327-333.
- Hancock J.L., y Hovell G.L.R., 1959, The collection of boar semen, Vet. Res., 71:664-669.
- 30 Harrop A.E. (1954), Artificial insemination of a bitch with preserved semen, Br. Vet. J., 110:424-425.
- Jaenicke, R. (1991), Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions, Eur. J. Biochem., 202, 715-728.
- Johnson F.H., Eyring H., Polissar M.J., 1954, The Cinetic Basis of Molecular Biology, Wiley, Nueva York.
- Kaarniranta K., Elo M., Sironen R., Lammi M.J., Goldring M.B., Eriksson J.E., Sistonen L., y Helminen H.J., 1998, Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 2319-2324.
- 35 Katila T., Combes G.B., Varner D.D., Blanchard T.L. (1997), Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen, Theriogenology, 1997, 48:1085-1092.
- LaTena A., Brandi A., Falconi M., Spurio R., Pon C.L., y Gualerzi CO., 1991, Identification of a cold-shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* major cold shock gene encoding nucleotide protein H-NS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10907-10911.
- 40 Ijaz A., Ducharme R. (1995), Effect of various extenders and taunne on survival of stallion sperm cooled to 5° C, Theriogenology, 1995, 44:1039-1050.
- Macdonald, A.G. (1987), The role of membrane fluidity in complex processes under high pressure, en: Jonnasch, H. W., Marquis, R.E., Zimmerman, A.M., editores, Current Perspectives in High Pressure Biology, Londres, Academic Press, pp. 207-223.
- 45 Maxwell W.M.C., y Johnson L.A., 1997, Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation, Theriogenology, 48:209-219.

- Molnar, M., Pribenszky, Cs., Cseh, S. y Solti, L. (2002), Investigation on viability of embryos after exposing to high hydrostatic pressure, *Theriogenology*, 52, 506.
- Murakami, T.H., Zimmerman, A.M. (1973), DNA syntheseis in Tetrahymena: a pressure study, *Cytobios*, 7, 171-181.
- 5 O'SHEA, T., WALES, R.G. (1964), EFFECTS OF POTASSIUM ON RAM SPERMATOZOA DURING CHILLING TO AND STORAGE AT 5 DEGREES C, *Journal Of Reproduction And Fertility*, volumen 53, agosto de 1964, páginas 121-132.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J., y Swanson, B.G. (1997), Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by high hydrostatic pressure, *Lebensm.-Wiss. U. Technol.*, 30, 703-708.
- 10 Pequeux, A., y Gilles, R. (1978), Effects of high hydrostatic pressures on the activity of the membrane ATPases of some organs implicated in hydromineral regulation, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 59, 207-212.
- Phadtare, S., Alasina, J., Inouye, M. (1999), Cold-shock response and cold-shock proteins, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 175-180.
- Pinto, C.R., Paccamonti, D.L., Elits, B.E. (1999), Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen, *Theriogenology*, volumen 52, número 4, septiembre de 1999, páginas 609-616.
- 15 Pribenszky C., Molnar M., Cseh S., Solti L., 2005a, Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge, *Anim. Reprod. Sci.*, 87, 143-150.
- Pribenszky C., Molnar M., Solti L., Dengg J., Lederer J., 2005b. The effect of high hydrostatic pressure on the motility of fresh and frozen-thawed bull semen (pilot study), *Reproduction in domestic animals*, 40, 338.
- 20 Pribenszky Cs., Molnar M., Cseh S., y Solti L., 2003, Viability of embryos after exposing to high hydrostatic pressure, *Theriogenology*, 59, 329 (resumen).
- Pribenszky Cs., Molnar M., Cseh S., y Solti L., 2004, Survival of mouse blastocysts after low temperature preservation under high pressure, *Acta Vet. Hung.*, 52, 479-487.
- Routray R., Suzuki T., Strussmann C.A., Takai R., 2002, Factors effecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka, *Oryzias latipes*, *Theriogenology*, 58:1483-1496.
- 25 Schmid, G., Lüdemann, H.D., y Jaenicke, R. (1975), High pressure effects on the activity of glycolytic enzymes, *Biophys. Chem.*, 3, 90-98.
- Schuster, B., Sleytr, U.B. (2002), The effect of hydrostatic pressure on S- layer-supported lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1563, 29-34.
- 30 Silva, J.L., Foguel, D., Royer, C.A. (2001), Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure, *Trends Biochem. Sci.*, 26, 612-618.
- Weber, G., Drickamer, H.G. (1983), The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules, *Q. Rev. Biophys.*, 16, 89-112.
- Welch, T.J., Farewell, A., Neidhardt, F.C., Bartlett, D.H. (1993), Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure, *J. Bacteriol.*, 175, 7170-7177.
- 35 Wemekamp-Kamphuis, H.H., Karatzas, A.K., Wouters, J.A., Abee, T. (2002), Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 456-463.
- Wouters, J.A., Jeynov, B., Rombouts, F.M., de Vos, W.M., Kuipers, O.P., Abee, T. (1999), Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactobacillus lactis* MG1363 in cryoprotection, *Microbiology*, 145, 3185-3194.
- 40 Yager, P., Chang, E.L. (1983), Destabilization of a lipid non-bilayer phase by high pressure, *Biochim. Biophys. Acta*, 731, 491-494.
- Yamanaka, K., Fang, L., Inouye, M. (1998), The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation, *Mol. Microbiol.*, 27, 247-255.

REIVINDICACIONES

- 1.- El uso de la presión hidrostática para mejorar la viabilidad de material biológico viable no destinado a la crioconservación, en el que dicho material biológico es un oocito de un animal vertebrado, que comprende:
- (a) aplicar una presión hidrostática en el intervalo de 10 a 100 MPa a dicho material biológico;
- 5 (b) mantener dicho material biológico viable a la presión hidrostática durante un periodo de tiempo de entre 10 segundos a 150 minutos;
- (c) liberar la presión hidrostática;
- con la condición de que dicho material biológico viable no es humano.
- 10 2.- El uso según la reivindicación 1, en el que dicho animal vertebrado es bovino, equino, caprino, ovino, porcino, otro tipo de ganado, mascotas, primates.
- 3.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha presión hidrostática está en el intervalo de 20 a 75 MPa.
- 4.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha presión hidrostática está en el intervalo de 30 a 60 MPa.
- 15 5.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha presión hidrostática se aplica durante un periodo de tiempo de entre 20 segundos a 90 minutos.
- 6.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha presión hidrostática se aplica durante un periodo de tiempo de entre 30 segundos a 60 minutos.
- 20 7.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha presión se libera gradualmente a lo largo de un periodo de tiempo entre la liberación instantánea y 6 horas.
- 8.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha presión se aplica, se mantiene y se libera según un perfil de presión predeterminado.
- 9.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha presión se aplica, se mantiene y se libera según un perfil de temperatura predeterminado.