

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 327**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2007** **E 07793911 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014** **EP 2048943**

54 Título: **Conservación y suministro/liberación controlado/a de espermatozoides**

30 Prioridad:

04.07.2006 GB 0613288
19.07.2006 US 807716 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.12.2014

73 Titular/es:

SPERMVITAL AS (100.0%)
HOLSETGATEN 22
2317 HAMAR, NO

72 Inventor/es:

KOMMISRUUD, ELISABETH;
HOFMO, PEER, OLA y
KLINKENBERG, GEIR

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 525 327 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

Conservación y suministro/liberación controlado/a de espermatozoides

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a partículas de biopolímero para la conservación de los espermatozoides no humanos. La presente invención puede también utilizarse en un procedimiento para la conservación, almacenamiento y liberación controlada del suministro de espermatozoides, y en la reproducción.

10

Antecedentes de la invención

La inseminación artificial (AI) es una técnica en la que los espermatozoides se sitúan en el útero o en el cuello del útero de un animal mediante medios artificiales más preferiblemente que mediante la cópula natural. Se utiliza ampliamente como procedimiento de apareamiento, y en la reproducción de animales para propagar características deseables, particularmente en el caso de animales de granja tales como el ganado bovino, cerdos, carneros, aves y caballos, pero también en el caso de mascotas tales como perros con pedigrí, animales acuáticos o especies en peligro de extinción.

15

Habitualmente, los espermatozoides se recogen, se extienden, y entonces, se conservan mediante, por ejemplo, crioconservación. La utilización de técnicas de crioconservación presupone que los espermatozoides de especies animales específicas toleran dicho tratamiento sin que se produzca un deterioro excesivo de la calidad, viabilidad y capacidad fertilizadora de los espermatozoides. Éstos se transportan entonces al lugar en el que está la hembra, crioconservados o congelados, lo que siempre es apropiado. Es vital que los espermatozoides se mantengan viables hasta que tenga lugar la inseminación, y durante un tiempo suficiente, dentro de la hembra, después de la inseminación, hasta que los óvulos alcancen el lugar de la fertilización.

20

25

La inseminación artificial de los animales de granja se ha utilizado desde la década de los 40, y en la actualidad se utiliza ampliamente en la industria de la agricultura, especialmente para la reproducción de las vacas lecheras y de los cerdos. Un panorama del desarrollo de la AI moderna y de los retos de los criadores con respecto a la utilización de la inseminación artificial y de la conservación de los espermatozoides, se da a conocer en R.H. Foote (2002), American Society of Animal Science (<http://www.asas.org/symposia/esupp2/Footehist.pdf>) y en "Reproduction in farm animals", editado por B. Hafez, E.S.E. Hafez. – 7th ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000. – XIII, ISBN 0-683-30577-8 (ib.). La inseminación artificial se ha convertido en un importante medio económico para la reproducción de animales en la industria de la agricultura tanto en cuanto a la reproducción animal con características genéticas preferidas, como en la producción animal en general.

30

35

Sin embargo, existen algunas limitaciones con respecto a la consecución de preñez en el animal hembra, cuando se lleva a cabo una inseminación artificial. Por ejemplo el tiempo de conservación y viabilidad de los espermatozoides recogidos, ambos durante el almacenamiento después de descongelación en caso de la crioconservación de los espermatozoides, y después de la inseminación, son esenciales para un exitoso resultado de la cría.

40

Las técnicas de conservación apropiadas que están disponibles para especies animales específicas, varían. Para el ganado bovino o vacuno, se utilizan ampliamente las técnicas de crioconservación. Por otra parte, los espermatozoides de otras especies, tales como cerdos, son menos tolerantes a las técnicas de crioconservación, que dan lugar a una flexibilidad menor con respecto al procesamiento seminal y a las posibilidades de almacenamiento.

45

Además, para obtener espermatozoides con una capacidad de fecundación apropiada, es deseable que el procedimiento de conservación utilizado, proporcione también el mantenimiento de la capacidad de fecundación, después de la inseminación. Se han llevado a cabo un gran número de investigaciones y se ha centrado la atención en procedimientos de conservación con el fin de proporcionar procedimientos de almacenamiento y medios que aseguren que los espermatozoides conservan la capacidad de fecundación durante más tiempo después de la recolección y hasta el momento de la inseminación.

50

55

Si la conservación del semen es menos duradera con respecto al mantenimiento de la capacidad de fecundación después de la inseminación, es más difícil acertar con el tiempo preferido de inseminación con respecto a la ovulación. En el caso de que las características de conservación sean de menos duración, son indispensables buenas técnicas de conservación para los espermatozoides, que proporcionen una mayor conservación, y, por tanto, una capacidad más duradera de fertilización. Todavía no existe un procedimiento de conservación disponible que proporcione una viabilidad de los espermatozoides y una conservación suficientes, durante un tiempo suficiente, después de la inseminación, que cumpla con las expectativas con respecto a la flexibilidad, especialmente cuando existe un transporte a larga distancia en el que además, se emplee tiempo, entre el lugar en el que se encuentre el macho, y por tanto, del lugar en el que se lleva a cabo la recolección del semen, y la hembra receptora.

60

65

Además, un procedimiento de conservación que dé lugar a una disponibilidad más controlada y duradera de los

espermatozoides, reducirá la necesidad de una provocación artificial de la ovulación mediante un tratamiento hormonal. Esto será beneficioso, tanto económicamente según las demandas del consumidor, como en relación a la salud de los animales.

- 5 Por tanto, son necesarios procedimientos que aseguren que los espermatozoides conservan la capacidad de fecundación para un tiempo más largo después de la inseminación, por ejemplo, que conserven la capacidad de fecundación durante un tiempo más largo cuando se sitúan en el interior de la hembra receptora.

10 Actualmente, la inseminación artificial (AI), en el ganado, se lleva a cabo ampliamente utilizando espermatozoides crioconservados. Éstos pueden almacenarse en nitrógeno líquido durante décadas hasta que son utilizados. Sin embargo, cuando los espermatozoides son descongelados, la inseminación artificial tiene que realizarse en pocas horas. Después de la inseminación, los espermatozoides crioconservados poseen potencial de fecundación durante 12-24 horas aproximadamente, y la inseminación artificial tiene que llevarse a cabo en aproximadamente 12-24 horas antes de la ovulación. Así, son necesarias técnicas de conservación para la reproducción del ganado, 15 proporcionando espermatozoides que presenten suficientes características de duración, y que conserven preferentemente capacidad de fecundación durante varios días.

20 En algunos países, los espermatozoides de toros que se almacenan en medio líquido, se utilizan para reducir el número de células espermáticas por dosis de AI. Los espermatozoides tienen capacidad fertilizante durante 24-36 horas aproximadamente antes de la inseminación. La AI debe realizarse en un plazo aproximadamente de 24 horas, después de la recogida de los espermatozoides. Sin embargo, los espermatozoides de toro conservados en líquido presentan varios inconvenientes tales como una duración acortada reducida y un alcance reducido de distribución.

25 En los cerdos, los espermatozoides crioconservados se utilizan sólo con propósitos especiales, como el de exportación, el envío a largas distancias y para el control de las enfermedades contagiosas. La inseminación artificial en los cerdos se realiza habitualmente con semen que se conserva en líquido. El tiempo de almacenamiento para el semen que se conserva líquido (espermatozoides), dependerá de qué extensor se utilice. Los espermatozoides diluidos con extensores a corto plazo conservan la capacidad de fecundación durante 2-3 días aproximadamente mientras que los espermatozoides diluidos con extensores a largo plazo pueden conservar la capacidad de 30 fecundación hasta durante 5-6 días. Después de la inseminación, la capacidad de fecundación de los espermatozoides dura aproximadamente 12-24 horas. La mayoría de las cerdas son inseminadas dos veces durante el calentamiento con 24 horas de intervalo aproximadamente. Con un sistema más flexible que proporcione un tiempo más largo de almacenamiento antes de la inseminación (por ejemplo, una semana) y/o un almacenamiento prolongado y una liberación de espermatozoides después de la inseminación (por ejemplo, de más de 24 horas), la 35 industria de las crías exhibirá una producción y distribución más eficientes, y los criadores tendrán menos necesidad de precisión en la temporización de la inseminación con respecto a la ovulación.

40 En la reproducción equina, el criador depende en su mayor parte de los espermatozoides recientes, debido a la falta de técnicas aplicables de conservación para los espermatozoides equinos. Existe un gran problema en la reproducción equina, y en la industria equina de carreras de caballos ya que el semental preferido para una yegua específica, se sitúa muy a menudo en un país diferente, lo que implica un largo tiempo de transporte. Además, debido a la falta de procedimientos apropiados de conservación para los espermatozoides equinos, la AI de los espermatozoides equinos recién preparados debe realizarse en las 24 horas después de la recolecta de los espermatozoides. La reproducción equina se trata, se esta forma, con una presión indeseada del tiempo, que a 45 menudo dé lugar a una reducción en la calidad reducida del esperma, o en la de la impregnación reducida, debido a una inseminación incorrecta respecto a la ovulación.

De este modo, son necesarios procedimientos de conservación que aseguren tanto una duración más larga con respecto al tiempo necesario de transporte de suministro como una duración mayor después de la inseminación. Un 50 procedimiento de conservación aplicable para el semen equino será de gran valor práctico y económico, y revolucionará posiblemente la industria de la reproducción equina.

Un sistema de conservación de los espermatozoides que proporcione una viabilidad suficiente tanto durante el almacenamiento como antes y después de la inseminación, será beneficioso para la industria de la crianza, en 55 general. Un sistema de conservación más flexible hará más fácil la labor de crianza para todas las especies animales, y dará lugar a un aumento en la fecundación exitosa. Un sistema en el que el criador depende menos de determinar el momento más preferible de la inseminación en el tiempo, con respecto a la ovulación, proporciona más flexibilidad.

60 Para ampliar la capacidad de fecundación de los espermatozoides eyaculados, se han investigado varios procedimientos de conservación, que incluyen la crioconservación y la conservación líquida.

Se han publicado varios estudios del almacenamiento de los espermatozoides en el interior de cápsulas. Estos estudios han utilizado procedimientos de encapsulación que dan lugar a una partícula en la que el espermatozoide 65 se localiza en el interior de un núcleo líquido rodeado por una membrana semipermeable.

- Nebel et al. (1985), Microencapsulation of bovine spermatozoa. J. Anim. Sci. 1985 60(6):1631-39, describen un procedimiento para encapsular espermatozoides bovinos en cápsulas fabricadas de alginato combinado con polilisina. Este procedimiento se basa en un procedimiento publicado previamente de Lim and Sun (1980), Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. Science 1980 210(4472): 908-10, que estaba trabajando en la producción de insulina encapsulada a partir de la encapsulación de células de Langerhans. Nebel et al. (1985) informó de resultados de inseminaciones que se habían almacenado tanto a 37°C como a 335°C, y los resultados para los espermatozoides encapsulados se compararon con muestras de control no encapsuladas. En este estudio, no se informó de diferencias significativas entre las muestras de control y las encapsuladas. Otros estudios publicados han demostrado también que los espermatozoides pueden encapsularse dentro de cápsulas con procedimientos similares, y conservar su funcionalidad *in vivo* (Munkittrick et al. (1992). Accessory sperm numbers for cattle inseminated with protamine sulfate microcapsules. J. Dairy Sci., 75(3): 725-31 (Bovine), Vishwanath et al. (1997) Selected times of insemination with microencapsulated bovine spermatozoa affect pregnancy rates of synchronized heifers. Theriogenology, 48: 369-76 (Bovine) y Maxwell et al. (1996), Survival and fertility of micro-encapsulated ram spermatozoa stored at 5°C. Reprod. Dom. Anim., 31:665-73 (Sheep), Munkittrick et al. (1992) y Vishwanath et al. (1997). Informan, sin embargo, de que los espermatozoides encapsulados no son tan eficientes como los no tratados cuando son inseminados al mismo tiempo. Esto se explicó diciendo que podía ocurrir que los espermatozoides encapsulados podrían necesitar algún tiempo para ser liberados de las cápsulas antes de que se produjera la fertilización.
- Conte et al. (1998), en el documento EP 0922 451 B1, concedido a la Universidad de Pavia y en la Degli Studi Di Milano y Torre et al. (2002), Boar semen controlled delivery system: storage and *in vitro* spermatozoa release. J. Control. Release, 85:83-89 han desarrollado un procedimiento alternativo para la encapsulación de los espermatozoides de jabalíes. En este procedimiento, los espermatozoides se añaden a una solución que contiene alginato. Una cápsula de calcio o de alginato de bario se forma espontáneamente alrededor de la gota, pues afecta la solución de alginato. Se reivindica que este procedimiento es más suave para las células, comparado con el descrito por Nebel et al. (1985). Otra ventaja es que este procedimiento implica una dilución muy pequeña de la solución de los espermatozoides, que se reivindica que es beneficiosa para la viabilidad de las células.
- Faustini et al. (2004), Boar spermatozoa encapsulated in barium alginate membranes: a microdensitometric evaluation of some enzymatic activities during storage at 18°C, Theriogenology, 61(1): 173-184 informa de una fracción significativa más grande de espermatozoides con acrosomas intactos, y menos fuga de enzimas de espermatozoides almacenados encapsulados con este procedimiento, comparada con los espermatozoides almacenados bajo condiciones idénticas.
- En un trabajo reciente, Weber et al (2006), Design of high-throughput-compatible protocols for micro-encapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa, Journ. Biotechnol., 123:155-163, da también a conocer un nuevo sistema para la encapsulación de espermatozoides bovinos. Este sistema está diseñado para una preparación de alta capacidad de procesamiento de espermatozoides encapsulados utilizando cápsulas de alginato de calcio o poli-dialil-dimetil sulfato de celulosa cloruro amónico pDADMAC.
- El documento WO95/19743 se refiere a revestimientos de capas múltiples de alginato, de tejidos biológicos y células para trasplante, en lo que las células o los trasplantes tisulares están revestidos con capas múltiples de alginato purificado, donde el objetivo es que el material revestido sobre el trasplante soporte o elimine reacciones destructoras fibrinogénicas y/o inmunes para la funcionalidad del trasplante, etc., permitiendo un trasplante exitoso a largo plazo de dicho tejido o células.
- El documento WO98/23226 se refiere a trasplante de tejido biológico revestido con múltiples capas de alginato estabilizado, apropiado para trasplante.
- La patente US nº 5.912.005 se refiere a la utilización de partículas sin recubrimiento gélico para ser implantadas en un huésped animal y proporcionar el inmunoaislamiento de las células encapsuladas sin provocar una respuesta fibrótica o un rechazo inmune del huésped.
- Torre et al., 1998, S.T.P. Pharma Science, 8(4), página 233-236 and Torre et al., 2000. Biomaterials, 21, páginas 1493-1498 informan de un procedimiento de encapsulación para espermatozoides de cerdos, en el que el semen de estos está encapsulado y, por tanto, presente en el núcleo líquido de las perlas resultantes de alginato cálcico.
- El documento EP 0 922 451 da a conocer microcápsulas que contienen material seminal para la inseminación artificial de cerdos, que contienen un núcleo líquido que incluye una suspensión de material seminal de cerdos y un polímero biocompatible y/o biodegradable, y una película, que está formada por un alginato de un material bivalente.
- Torre et al., 2002, Journal of Controlled Release, 85, páginas 83-89 da a conocer todavía un sistema de suministro seminal, en el que el semen de jabalí se encapsula en cápsulas poliméricas.
- Weber et al., 2006, Journal of Biotechnology, 123 páginas 155-163, dan a conocer protocolos para la microencapsulación, crioconservación y liberación de espermatozoides bovinos, compatibles con una alta

especialidad de procesamiento.

El documento EP 0 652 015 da a conocer una composición de liberación continua que incluye un agente terapéutico catiónico, un alginato multivalente catiónico entrecruzado, que define además su relación peso/peso.

Finalmente, Chou et al., documento US 6.596.310 B1 (2003) dan a conocer un procedimiento de inseminación artificial mediante la liberación temporal de esperma a partir de cápsulas o perlas sólidas, donde el esperma se conserva en un estadio no capacitado debido a la utilización de una fuente energética que no permite la capacitación.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la inclusión de espermatozoides no humanos en el interior de matrices biopoliméricas, donde éstas están formadas por alginato rico en ácido gúlorónico, da lugar a espermatozoides no humanos con características de conservación superiores con respecto a la duración, viabilidad y fertilización. Las partículas de biopolímero y sus espermatozoides no humanos pueden, de este modo, utilizarse en la inseminación artificial de los animales.

Una ventaja no limitativa de este sistema biopolimérico de conservación espermatozoidea, es que proporciona beneficios provocando una capacidad fertilizante de los espermatozoides no humanos durante un período más largo después de la inseminación y haciendo, de este modo, que el tiempo de inseminación con respecto a la ovulación, sea menos crítico.

Las partículas de biopolímero según la presente invención pueden utilizarse en la reproducción y producción de animales en la industria agrícola. Las partículas de biopolímero pueden utilizarse, por tanto, cuando el objetivo es proporcionar animales con unas características específicamente deseables. Las partículas de biopolímero pueden utilizarse asimismo cuando el objetivo es producir animales en general, por ejemplo, en la producción de ganado bovino.

Según esta invención, las partículas de biopolímero pueden utilizarse directamente e inseminarse como tales, en el animal receptor, si la partícula biopolimérica, tal como partículas de alginato, se disuelve en condiciones fisiológicas en el interior del animal receptor (es decir, dentro del útero o del cuello de éste). Las partículas de biopolímero según la presente invención proporcionan, de este modo, una liberación controlada de los espermatozoides no humanos. Estos pueden disolverse también a partir de la partícula biopolimérica, antes de la inseminación de los espermatozoides no humanos.

Tal como se expone anteriormente, la técnica anterior sugiere principalmente la encapsulación de los espermatozoides en cápsulas biopoliméricas, en las que los espermatozoides se contienen en un núcleo líquido de una cápsula biopolimérica. Sólo una referencia (Chou et al., documento US 6.596.310 B1), menciona la posibilidad de incluir los espermatozoides en una matriz polimérica sólida, aunque no se conocen ejemplos de las perlas sólidas que se mencionan en dicho trabajo.

En el contexto de la presente invención se ha descubierto un enfoque distinto para la inmovilización de los espermatozoides. Según la presente invención, estos espermatozoides no humanos están incluidos en una red de geles sólidos realizada en geles de alginato, en la que el alginato utilizado es rico en ácido gúlorónico. Se descubrió que la inmovilización en el interior de una red de gel sólida posee varias ventajas comparada con la encapsulación en el interior de cápsulas y perlas dadas a conocer en la técnica anterior.

Sin limitarse a una teoría específica, se asume que, utilizando las partículas de biopolímero y el procedimiento según la presente invención, la inclusión da lugar a una inmovilización, es decir, los movimientos naturales de los espermatozoides se restringen, debido a las limitaciones de la red géllica. Una limitación física del movimiento debida a las altas concentraciones celulares y a la presencia de polímeros de alta viscosidad, pueden constituir uno de los factores que influyen la supervivencia y el mantenimiento de la funcionalidad de los espermatozoides en la cola del epidídimo (Watson 1993). Los espermatozoides se almacenan durante largos períodos de tiempo (más de una semana) en la cola del epidídimo (Watson 1993). La utilización de alginato rico en ácido gúlorónico hace posible proporcionar partículas de biopolímero que comprenden espermatozoides que pueden utilizarse en la práctica como un sistema de conservación y que puede utilizarse en la inseminación artificial, por ejemplo, en la reproducción de los animales.

De este modo, según un aspecto, la invención proporciona partículas de biopolímero para la conservación de los espermatozoides no humanos, donde éstos están embebidos en una red de gel de biopolímero, y donde las partículas de biopolímero que incluyen los espermatozoides no humanos, comprenden alginato rico en ácido gúlorónico.

Según otro aspecto de la presente invención, el biopolímero que embebe los espermatozoides comprende alginato cálcico.

Según, todavía, otro aspecto de la invención, la concentración del alginato en las partículas de biopolímero de la invención, es, por lo menos del 0,1%.

- 5 Según, todavía, otro aspecto de la invención, la concentración de alginato en las partículas de biopolímero de la invención está entre, por lo menos, el 0,1% y el 6% de alginato.

Según, todavía, otro aspecto de la invención, la concentración de alginato en las partículas de biopolímero es, por lo menos del 1%.

- 10 Además, según un aspecto de la invención, la concentración de los espermatozoides en las partículas de biopolímero es, por lo menos, de $0,1 \times 10^6$ espermatozoides/ml, tal como, por ejemplo, 100×10^6 espermatozoides/ml, tal como hasta, por lo menos, $2,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml.

- 15 Según, todavía, otro aspecto, las partículas según la presente invención se almacenan en una solución, por ejemplo, en la que la relación solución de almacenamiento: partículas de biopolímero es, por lo menos, de entre 1:1 y 1:100.

- 20 Según, todavía, otro aspecto, los espermatozoides pueden coembeberse con compuestos o agentes que son beneficiosos según la capacidad fertilizante y/o la salud animal, tal como, por ejemplo, uno o más de los compuestos o agentes seleccionados entre el grupo no limitativo formado por extensores, crioprotectores, antibióticos, anticuerpos, antioxidantes, proteínas y hormonas.

- 25 Según otro aspecto de la invención, los espermatozoides son coembebidos con uno o más antioxidantes seleccionados a partir del grupo formado por piruvato, 2,2,6,6-tetrametil piperidina-1-oxilo, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxilo, superóxido-dismutasa, catalasa, glutatiónperoxidasa, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado.

- 30 Según otro aspecto, las partículas de biopolímero, están revestidas a partir del grupo no limitativo formado por polilisina, quitosan, sulfato de celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y cloruro polidialildimetil amónico.

- 35 Las partículas de biopolímero según la presente invención comprenden espermatozoides seleccionados de un animal seleccionado a partir del grupo no limitativo formado por cerdos, ganado bovino, caballos, carneros, machos cabríos, conejos, aves de corral, mascotas tales como perros con pedigrí, animales acuáticos y especies animales en peligro de extinción, preferentemente cerdos, ganado bovino, animales de peletería y caballos. Las partículas de biopolímero de la presente invención pueden, de este modo, utilizarse para conseguir preñez en un animal hembra, mediante procedimientos de fecundación artificial habitual, tales como AI, IVF y ICSI.

- 40 Según un aspecto de la invención, los espermatozoides utilizados para formar dichas partículas se contienen en el líquido seminal.

Opcionalmente, las partículas de biopolímero pueden tratarse posteriormente mediante deshidratación, crioconservación o liofilización.

- 45 La invención proporciona, asimismo, un procedimiento para preparar partículas según la invención, en el que una mezcla de alginato rico en ácido gulurónico y espermatozoides no humanos, se añade gota a gota a una solución gelificante. Ésta comprende, según un aspecto de la invención, uno o más de los iones siguientes seleccionados a partir del grupo no limitativo formado por los de calcio, sodio, bario y magnesio, preferentemente, calcio y sodio.

- 50 Además, las partículas de biopolímero pueden formarse opcionalmente, directamente, en un contenedor seminal.

Según un aspecto del procedimiento de la invención, las partículas se tratan posteriormente mediante deshidratación, crioconservación o liofilización.

- 55 Según, todavía, otro aspecto, las partículas se disuelven antes de la inseminación. Según, todavía otro aspecto, las partículas de la invención se utilizan conjuntamente con espermatozoides no humanos libres e inmovilizados.

- 60 Finalmente, la presente invención puede utilizarse en un procedimiento para la fecundación de un animal, en el que los espermatozoides no humanos conservados en partículas según esta invención, se introducen en un animal hembra receptor.

Breve descripción de las figuras

- 65 La figura 1 muestra un almacenamiento *in vitro* de espermatozoides bovinos (cuadro A) y de jabalíes (cuadro B) a temperatura ambiente (bovinos 20°C, y de jabalíes, 18°C). Como funciones del tiempo de almacenamiento se proporcionan valores de motilidad en muestras de referencia y en muestras con espermatozoides inmovilizados.

Figura 2: Muestra un almacenamiento *in vitro* de espermatozoides bovinos (cuadro A) y de jabalíes (cuadro B), a 37°C. Como funciones del tiempo de almacenamiento en muestras de referencia y en muestras con espermatozoides inmovilizados, se dan valores de motilidad.

Figura 3: Muestra el almacenamiento *in vitro* de espermatozoides de jabalíes a temperaturas ambiente (18°C). Se proporcionan valores de motilidad como funciones del tiempo de almacenamiento en muestras de referencia y en muestras con espermatozoides inmovilizados. En los experimentos de almacenamiento, se han utilizado distintas cantidades de medio de almacenamiento respecto a la cantidad de perlas, tal como se indica en la denominación de la serie. Los espermatozoides se inmovilizan en perlas con un diámetro de 1 mm, a una concentración de 1×10^9 espermatozoides/ml.

Figura 4: Almacenamiento *in vitro* de espermatozoides de jabalíes a temperaturas ambientales de 18°C. Los valores de motilidad se proporcionan como funciones del tiempo de almacenamiento en muestras con espermatozoides inmovilizados. Las perlas con distintas concentraciones de espermatozoides inmovilizados se utilizan en los experimentos de almacenamiento, tal como se indica en la denominación de las series. Los espermatozoides se inmovilizan en perlas con un diámetro de 3 mm.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha descrito anteriormente, el foco principal de investigación se dirigió previamente hacia la encapsulación de los espermatozoides, para facilitar la fecundación *in vitro* y la inseminación artificial. Se ha propiciado un procedimiento fundamentalmente distinto para inmovilizar a los espermatozoides no humanos, en el que éstos se embeben en un gel, o una red biopolimérica en el interior de un gel sólido particulado, y donde la red biopolimérica incluye alginato rico en ácido gúlorónico. Este enfoque es fundamentalmente distinto del anteriormente descrito en la técnica anterior de encapsulación de los espermatozoides, en el que éstos se contienen en el interior de una cápsula con un núcleo líquido donde los espermatozoides pueden moverse alrededor como en su medio natural. Las partículas de biopolímero que se incluyen en los espermatozoides no humanos según la presente invención, no dependen de la utilización de soluciones que aseguran que los espermatozoides animales se conservan en un estado de no capacitación.

El término “embebido” o “que se embebe” tal como se utiliza en la presente memoria, se debe entender como de inmovilización de los espermatozoides no humanos, lo que da lugar a que éstos se ven imposibilitados de su posibilidad natural de movimiento. El grado de inmovilización variará, dependiendo de las características de las partículas de biopolímero, tal como, por ejemplo, la fuerza mecánica y el tipo de polímero utilizado. Sin embargo, debe entenderse que los espermatozoides embebidos en las partículas de biopolímero según la presente invención están impedidos de su posibilidad natural de movimiento, posibilidad que tendrían, de otro modo, si se almacenaran en líquido, tal como en un núcleo líquido de una cápsula.

El término “partícula de biopolímero” tal como se utiliza en la presente memoria hace referencia a una partícula, la cual, cuando incluye espermatozoides no humanos, propicia una posibilidad reducida de movimientos. Las partículas de biopolímero, según la presente invención, están compuestas por un material que forma una red, que consiste en un gel de alginato que es rico en ácido gúlorónico. La función de la partícula biopolimérica con respecto a la conservación de los espermatozoides es independiente de la forma tridimensional de la partícula biopolimérica según la presente invención. Así, las partículas de biopolímero según la presente invención pueden tener distintas formas tales como, por ejemplo, esféricas o cilíndricas.

El alginato es un polímero que está compuesto por ácido gúlorónico (G) y ácido mannurónico (M). El alginato es un constituyente habitual de las paredes celulares en todas las especies de las algas pardas (*Phaeophyceae*) y se extrae habitualmente mediante solución alcalina. Las proporciones del ácido mannurónico al gúlorónico (M/G) en el alginato varían ampliamente, dependiendo de los alginofitos específicos (algas que producen alginatos) y de las varias estaciones.

El alginato es también sintetizado por las bacterias *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Svanem et al., (2001), *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 276:34, 31542-31550, Jain et al., (2003), *Molecular Microbiology*, 47(4), 1123-1133, Scott and Quatrano (1982), *Applied and Environmental Microbiology*, 44:3, 754-756.

Los alginatos se utilizan ampliamente, por ejemplo, en la industria alimentaria, como, por ejemplo, estabilizadores y para el control de la viscosidad, en la industria farmacéutica y cosmética, como, por ejemplo, desintegrante. Con diversos propósitos, están disponibles alginatos ricos en ácido gúlorónico o mannurónico, respectivamente (Mancini et al., (1999), *Journal of Food Engineering* 39, 369-378) y se conocen varios procedimientos para obtener alginatos ricos en ácido gúlorónico, por ejemplo, que se dan a conocer en el documento WO 8603781, y las patentes US nº 4.990.601, US nº 5.639.467.

El término “alginato rico en ácido gúlorónico” o “alginatos ricos en G”, tal como se utiliza en la presente memoria, significa alginatos que incluyen cantidades más altas de ácido gúlorónico que de ácido mannurónico en las cadenas

poliméricas que comprenden el polisacárido. Los ejemplos del significado del término “ricos en G”, tal como se utiliza habitualmente por los expertos en la materia, son evidentes a partir de la técnica anterior establecida en los dos párrafos anteriores.

Los geles de alginato se forman debido a las interacciones entre iones divalentes tales como el Ca^{2+} y estructuras tipo bloque del ácido gulurónico en la cadena polimérica del alginato. Por tanto, la formación de los geles de alginato puede llevarse a cabo en condiciones muy suaves, y es apropiada para la inmovilización de una célula. Los geles de alginato se han utilizado, pues, habitualmente para inmovilizar distintos tipos celulares. Sin embargo, la inmovilización en alginato se utiliza muy habitualmente como el principio para una formación ulterior de varios tipos de cápsulas con un núcleo líquido.

Cuando en la presente invención se hace referencia en adelante al alginato, al gel de alginato, a la red de alginato, o a las partículas de biopolímero según la presente invención, debe apreciarse que dicho alginato, gel de alginato, partícula de alginato o red biopolimérica o partícula según la presente invención, es rica en ácido gulurónico.

Los ejemplos no limitativos de tipos apropiados de alginato son FMC LF 10/40, FMC LF 10/60 y FMC LF 20/60, disponibles en FMC Biopolymer AS, Drammen, Noruega o A2033 de Sigma, Oslo, Noruega.

El término “duración” tal como se utiliza en la presente memoria, significa el tiempo que los espermatozoides conservan la capacidad de fecundación, tanto con respecto al almacenamiento *in vitro* antes de la inseminación, como *in vivo*, como después de la inseminación en el animal receptor. La duración específica de los espermatozoides de los distintos orígenes, puede variar. Sin embargo, este sistema de conservación, en el que los espermatozoides se embeben en partículas de biopolímero según la presente invención, proporciona una duración más larga después de la inseminación, comparada con los espermatozoides que se inseminan después de los procedimientos convencionales de almacenamiento después de la recogida del semen. Según un ejemplo de la invención, los espermatozoides de los cerdos conservan una capacidad de fecundación excelente durante más de 12 horas después de la inseminación más preferiblemente más de 24 horas después de la inseminación. Según, todavía, otro ejemplo de la invención, los espermatozoides de los toros conservan una capacidad de fecundación excelente de más de 12 horas después de la inseminación, más preferentemente de más de 24 horas después de ella.

El término “reproducción”, tal como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier procedimiento para conseguir la preñez en un animal hembra. Una lista no limitada de dichos procedimientos incluye IVF, la inseminación artificial e ICSI. Además, la reproducción comprende tanto la reproducción respecto a proporcionar animales que posean características específicamente deseables como respecto a la producción comercial.

El término “espermatozoide” tal como se utiliza en la presente invención, incluye los espermatozoides como tales, y también, los contenidos en el líquido seminal, es decir, el semen puede utilizarse directamente cuando se forman los biopolímeros según la presente invención. Sin embargo, también los espermatozoides aislados del líquido seminal, que se contienen opcionalmente en otras soluciones apropiadas de almacenamiento, pueden también utilizarse para formar las partículas de biopolímero según la presente invención.

El término “contenedor de semen” tal como se utiliza en esta invención, incluye todos los tipos de empaquetamiento apropiado para el mantenimiento y almacenamiento de los espermatozoides.

Los procedimientos previos de encapsulación que se dan a conocer en la técnica anterior y tal como se exponen anteriormente, son laboriosos, y los procedimientos de inmovilización contienen normalmente varias etapas. Sin embargo, la preparación de las partículas de biopolímero según esta invención puede llevarse a cabo en un procedimiento de una etapa. Más exactamente, las partículas de alginato cálcico que contienen espermatozoides no humanos, se forman fácilmente con un mínimo estrés fisiológico y químico para las células inmovilizadas. Las partículas de alginato pueden formarse con varias formas y de distintos tipos, y con tipos variables de alginato, concentraciones de alginatos y concentraciones de espermatozoides no humanos inmovilizados.

Con el fin de embeber los espermatozoides no humanos según la invención, la utilización del alginato como el material biopolimérico es particularmente apropiado debido al hecho de que i) se pueden formar geles durante condiciones suaves, ii) el alginato no es tóxico, tanto con respecto a los espermatozoides como para el animal receptor, y iii) el alginato se disuelve bajo condiciones fisiológicas y de esta forma puede liberar los espermatozoides no humanos en el interior del útero o del cuello de éste.

Según un aspecto de esta invención, las partículas de alginato se preparan añadiendo una solución que incluye alginato y espermatozoides, gota a gota, a una solución gelificante, dando lugar a la formación de perlas de alginato con los espermatozoides no humanos embebidos en ellas.

La preparación de las perlas de alginato es conocida por los expertos en la materia, por ejemplo, tal como se da a conocer en Smidsrod, O. and Skjåk-Bræk, G. (1990) Alginate as immobilization matrix for cells, Trends in Biotechnology 8, 71-78 y US 6.497.902.

Diversas soluciones géllicas pueden aplicarse para formar partículas de biopolímero tales como perlas de alginato. Las diversas soluciones que son apropiadas para formar varias partículas de biopolímero están de acuerdo con el conocimiento del experto en la materia. Según la presente invención, los iones bivalentes (también denominados, en la presente memoria, iones gelificantes), tales como el calcio y el bario, pueden utilizarse para formar las partículas de alginato, por ejemplo, conseguir la gelificación del alginato. El alginato forma geles en presencia de muchos iones bivalentes y multivalentes. La utilización de iones cálcicos da lugar a la rápida gelificación y a partículas relativamente considerables. Por otro lado, la utilización de los iones báricos da lugar incluso a partículas más grandes que son más estables bajo condiciones fisiológicas. Debe apreciarse que el tipo y cantidad de los iones géllicos que vayan a utilizarse para formar las partículas de biopolímero según esta invención, pueden variar según entre otros la fuerza que se desee del gel formado, el tipo y concentración del alginato utilizado, el contenido en ácido gulurónico y la longitud del bloque G del alginato, el tipo y origen de los espermatozoides utilizados, el tipo de agentes adicionales que se incorporen a las partículas (tales como antibióticos, extensores, antioxidantes, etc.) y de dichas modificaciones pertenezcan al alcance de la presente invención. Basándose en la técnica anterior y en la orientación de esta solicitud, el experto identificará y determinará, sin una carga excesiva, varios compuestos que pueden coembeberse con los espermatozoides en las partículas de biopolímero según la presente invención.

Según un aspecto de la presente invención, los iones cálcicos y sódicos se utilizan para formar partículas de biopolímero. Así, variando la concentración de alginato y el grado de entrecruzamiento, se pueden obtener partículas con varias características de liberación de los espermatozoides no humanos y que está por ejemplo, adaptada a especies específicas de animales o a condiciones de ovulación en diversos animales.

Además, la concentración de alginato influencia las características mecánicas de las partículas de biopolímero y por tanto, también las características de disolución de las partículas. La concentración de alginato puede, de esta forma, variar dependiendo de las características de disolución necesarias en cada caso, dependientes de, por ejemplo, el animal receptor. El experto en la materia, basándose en su conocimiento general y en la orientación de esta invención, y sin una carga excesiva puede determinar las diversas concentraciones aplicables de alginato rico en G, para utilizarlas cuando se preparan las partículas de biopolímero según la presente invención. Según un aspecto de la invención, la concentración de alginato en las partículas de biopolímero según la presente invención, está entre por lo menos 0,1 y 6%.

La concentración de espermatozoides no humanos embebidos en las partículas de biopolímero según la presente invención puede variar, dependiendo de, por ejemplo, el tipo/fuente de los espermatozoides, crianza, animal receptor, técnica o sistema de inseminación, técnicas o sistema de fertilización, la presencia de otros agentes incluidos en las partículas (antibióticos, antioxidantes, extensores, proteínas, etc.). En principio, no existe un límite inferior de la concentración de espermatozoides no humanos, pudiendo variar ésta dependiendo de, por ejemplo, el procedimiento de fertilización, el origen de los espermatozoides, el animal receptor, las características de disolución de las partículas de biopolímero, etc. Con la orientación de esta memoria y el conocimiento general, el experto en la materia, sin una carga excesiva, determinará la concentración de espermatozoides apropiada para ser utilizada en cada caso, basada en el procedimiento deseado de fertilización, origen de los espermatozoides, animal receptor, etc. Pueden utilizarse cantidades inferiores de espermatozoides cuando ICSI se utiliza como procedimiento de fecundación deseado comparado con, por ejemplo, la inseminación artificial.

Según un aspecto de la invención, la concentración de los espermatozoide es así de por lo menos $0,1 \times 10^6$ espermatozoides/ml.

Los hallazgos de la presente invención muestran que para algunos animales, la supervivencia de los espermatozoides aumenta mucho con la subida de los espermatozoides. Así, según un ejemplo de la presente invención, $2,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml de los cerdos, por lo menos, se embeben en las partículas de biopolímero (figura 4). Sin embargo, 100×10^6 espermatozoides/ml de los cerdos da también lugar a preñez en los animales hembra. Para los espermatozoides de toro, se pueden aplicar los mismos intervalos de concentración que para los espermatozoides de los cerdos.

La concentración de los espermatozoides no humanos en las partículas bioméricas puede modificarse posteriormente cambiando la cantidad de espermatozoides con respecto a la cantidad de alginato antes de gelificación, o mediante la concentración o dilución de la solución de espermatozoides antes de llevar a cabo la mezcla de la solución de alginato y de la que contiene los espermatozoides. Sin embargo, ya que la modificación de la cantidad de espermatozoides da finalmente lugar a una modificación de la concentración de alginato en las partículas obtenidas, la concentración de alginato en la solución inicial de éste debe ajustarse si la concentración del alginato en las partículas de biopolímero debe conservarse. Debido a la alta viscosidad del alginato en solución, podría prácticamente ser dificultoso utilizar la solución de alginato con más de un 4-6% de alginato. De este modo, según un aspecto de la invención, las partículas de biopolímero están compuestas de alginato con una viscosidad baja.

Además, los espermatozoides no humanos embebidos en las partículas bioméricas según la presente invención se aíslan de alguna manera del ambiente circundante, y no se liberan hasta que la red de gel de alginato cálcico, se

disuelve. Además esta red se disuelve lentamente bajo condiciones fisiológicas, lo que provoca una lenta liberación de espermatozoides a partir de la matriz de inmovilización. Debido a este efecto los espermatozoides con capacidad de fecundación pueden encontrarse durante períodos de tiempo más largos. Las proporciones de disolución pueden estar controladas utilizando distintos tipos de revestimiento sobre la matriz de inmovilización. Se conocen varios revestimientos de utilidad que comprenden de manera no limitativa a polilisina, quitosano, sulfato de celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o cloruro de polidialildimetil-amonio.

Para mejorar la calidad de los espermatozoides no humanos, éstos pueden coembeberse en las diversas soluciones de importancia para la supervivencia y vitalidad de los espermatozoides. Según una forma de realización de la invención se incluye un extensor en la partícula biopolimérica de la presente invención.

Los extensores de los espermatozoides no humanos son utilizados habitualmente con diversos propósitos:

- para aumentar el volumen
- para estandarizar el número de espermatozoides en la dosis AI
- para procurar la capacidad del tampón
- para proporcionar un ambiente fisiológico con respecto a la osmolaridad
- para soportar la nutrición para las células espermáticas
- para controlar la contaminación microbiológica (antibióticos) o en el caso de la crioconservación
- para proteger las células espermáticas de las alteraciones provocadas por el descongelamiento y la crioconservación.

Es adecuado para el conocimiento del experto en la materia, seleccionar un extensor apropiado que pueda utilizarse en las partículas de biopolímero según esta invención, que se basa en, por ejemplo, el tipo de espermatozoides (origen), especie, procedimiento de conservación, temperatura de almacenamiento, procedimiento de inseminación, requerimientos zoonosanitarios y legislación internacional. Los extensores lácteos y TRIS constituyen sólo unos pocos ejemplos no limitativos de extensores, de entre un gran número de extensores de espermatozoides comercialmente disponibles. Otros extensores útiles son de los que se informa en Aalbers, JG, Rademaker, JHM, Grooten, HJG and Johnson, LA, 1983: Fecundity of boar semen stored in BTS, Kiev, Zorlesco and Modena extenders under field conditions. J. Anim. Sci. 75 (Suppl. 1), 314-315 and Aalbers, JG, Johnson, LA, Rademaker, JHM and Grooten HJG, 1984: Use of boar spermatozoa for AI: fertility and morphology of semen diluted in BTS and used for insemination within 24 hrs or 25 to 48 hrs after collection. Proc. 10th Int Congr. Anim. Reprod and Artif. Insemin. Urbana IL, Vol II, No 180, pp 1-3, commonly known as the BTS. BTS está comercialmente disponible en Minitüb i Tyskland. (Minitüb Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co. KG, Hauptstrasse 41, DE-84184 Tiefenbach, Alemania).

Otro extensor útil, todavía, es el Tri X-CellTM disponible comercialmente en IMV (Instrument de Medecine Veterinaire, 10, rue Georges Clemenceau, B.P. 81, FR-61302 L'AIGLE Cedex, Francia).

Los diversos extensores difieren en composición, pH, capacidad tampónica, osmolaridad y antibióticos. Muchos están publicados mientras otros son secretos comerciales. Los extensores más sencillos están compuestos sólo de distintas soluciones azucaradas, como por ejemplo de lactosa y glucosa. Basándose en el conocimiento general del experto en la materia de la conservación del esperma, debe apreciarse que varios extensores pueden utilizarse según esta invención. El tipo de extensores utilizado según la invención puede variar lo que depende del origen del esperma, tipo de polímero utilizado, procedimiento de conservación, temperatura de almacenamiento, etc. Es adecuado para el conocimiento del experto en la materia determinar y seleccionar el tipo y la cantidad apropiada del extensor utilizado sin partir del alcance de la invención dado a conocer en la memoria y en las reivindicaciones adjuntas.

Las partículas de biopolímero según la presente invención puede ser de varias formas según los procedimientos conocidos en la técnica anterior. Qué tipo de forma es apropiada depende de varios factores tales como la fuente de espermatozoides, el tipo y tamaño del dispositivo de fecundación empleado, tamaño y forma del contenedor de semen utilizado. Las partículas de biopolímero según la presente invención, pueden formarse con un diámetro apropiado para todas las técnicas de inseminación de la técnica anterior, para permitir la fácil manipulación, manejo, transporte y conservación.

Según, todavía, otro aspecto de la invención, las partículas de biopolímero se formen dentro de un contenedor, tal como por ejemplo, en una paja, de inseminación, lo que da lugar a partículas perfectamente ajustadas perfectamente al tamaño del contenedor. Así, en el caso de formar las partículas de biopolímero en el interior de un contenedor, puede no necesitarse una ulterior solución para el almacenamiento

Según un aspecto de la invención, las partículas de biopolímero incluyen espermatozoides recogidos del ganado. Según otro aspecto, todavía, estas partículas de biopolímero incluyen espermatozoides obtenidos de los cerdos.

Aunque esta invención se ilustra mediante partículas de alginato que incluyen espermatozoides recogidos a partir del ganado bovino y de los cerdos, respectivamente, en las partículas de biopolímero pueden también embeberse espermatozoides de otras especies animales sin limitación, recogidos por ejemplo, de caballos, carneros, machos cabríos, conejos, aves y mascotas tales como perros con pedigrí, animales acuáticos y varias especies en peligro de extinción.

Además, no existen indicaciones de que, alguna vez estas partículas de biopolímero podrían no ser útiles en la conservación de los espermatozoides humanos, y, de este modo, útiles para el tratamiento de las enfermedades de los niños. Así, debe apreciarse que el término "animal" tal como se utiliza en la presente memoria, también comprende el ser humano.

Además, las técnicas de conservación de espermatozoides también se demandan ampliamente en la industria de la acuicultura. De este modo, también los espermatozoides que se originan de los animales acuáticos podrían embeberse en las partículas de biopolímero según la presente invención y, por lo tanto, están también comprendidas por el término "animal" tal como se utiliza en la presente memoria.

La inmovilización de los espermatozoides no humanos en el interior de una red de gel de biopolímero, puede utilizarse también para crear un microambiente que es beneficioso para el almacenamiento de los espermatozoides, incluso en el interior de los órganos reproductores femeninos. Esto puede llevarse a cabo con soluciones posteriores coembebidas que son beneficiosas con respecto a los espermatozoides, el grado de fertilización, la salud de los animales, etc. Por ejemplo, los ejemplos no limitativos de sustancias que potencian la viabilidad durante el almacenamiento, son antioxidantes o proteínas, hormonas, etc. Los espermatozoides pueden también coembeberse con otros agentes o compuestos, que son beneficiosos con respecto a la capacidad de fecundación o de la salud animal. Dichos agentes o compuestos pueden ser por ejemplo, antibióticos, tales como, por ejemplo, estreptomicina, neomicina, gentamicina, penicilina, lincomicina, espectinomicina, amoxicilina, tilosina, etc. que pueden utilizarse para controlar o evitar las enfermedades venéreas, crioprotectores, anticuerpos, hormonas, o compuestos que aumentan la eficiencia reproductora, por ejemplo, como los compuestos conocidos a partir de la patente US nº 5.972.592.

Así, según todavía otro aspecto de la invención, las partículas de biopolímero incluyen además de los espermatozoides no humanos, compuestos que son beneficiosos con respecto a la capacidad de fecundación o a la salud animal, como por ejemplo, antioxidantes, antibióticos, anticuerpos, hormonas o agentes que aumentan la eficiencia reproductora, o sus combinaciones. Según una forma de realización preferida de la presente invención, las partículas de biopolímero comprenden antioxidantes, por ejemplo, tal como piruvato.

Las partículas de biopolímero según la presente invención pueden almacenarse opcionalmente en soluciones de almacenamiento bien conocidas de espermatozoides, tales como, por ejemplo, extensores lácteos, PBS (solución salina tamponada de fosfato), BTS Tri X-Cell™, EDTA-extensores, Kiev-extensores, Modena, MR-A, Androhep, Acromax, Triladyl®, Biladyl®, Bioxcell, Biociphos plus, etc., con o sin antioxidantes tales como por ejemplo, piruvato, 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo (que se abrevia habitualmente como Tempo), 4-hidroxi-2,2,6,6-tetra-metil-piperidin-1-oxilo (que se abrevia habitualmente como Tempo I), superóxido-dismutasa, catalasa, glutatiónperoxidasa, hidroxitolueno butilado (abreviado habitualmente como BHT), hidroxianisol butilado (abreviado habitualmente como BHA). La elección de la solución de almacenamiento no es crítica siempre que la solución de almacenamiento no incluya compuestos que puedan afectar negativamente las características de las partículas de biopolímero. Por ejemplo, en el caso de partículas de alginato, la solución de almacenamiento no incluirá demasiados quelantes que den lugar a la retirada de los iones bivalentes y, por tanto, la disolución del gel.

Durante el almacenamiento, la proporción de partículas de biopolímero respecto a la solución de almacenamiento puede variar, dependiendo del tipo y concentración del alginato rico en G, de la fuente de los espermatozoides, del procedimiento de fecundación utilizado, etc. Según los ejemplos de la presente invención, la proporción de partículas de biopolímero: solución de almacenamiento es por lo menos de 1:1, tal como por ejemplo, por lo menos, de 1:2, por lo menos de 1:3, por lo menos de 1:4, por lo menos de 1:5, por lo menos de 1:6, por lo menos de 1:7, por lo menos de 1:8, por lo menos de 1:9 o por lo menos de 1:10. Según la presente invención, puede utilizarse una proporción de solución de almacenamiento: partículas de biopolímero de hasta por lo menos de 1:100.

Además, las partículas de biopolímero según la presente invención, pueden guardarse opcionalmente tanto bajo temperatura ambiente, por ejemplo, a 18 o 20°C, como a temperatura fisiológica (37°C), o en condiciones de enfriamiento, por ejemplo a 5°C. Además, las partículas de biopolímero pueden tratarse ulteriormente mediante deshidratación, crioconservación o liofilización. Las partículas de biopolímero se descongelan entonces, en el caso de crioconservación, antes de la inseminación.

Los espermatozoides no humanos, que habitualmente se conservan en líquido, pueden almacenarse durante un período de tiempo más largo, cuando se embeban en una partícula biopolimérica según la presente invención. Según otra forma de realización de la invención, las partículas de biopolímero se utilizan directamente para

inseminar un animal receptor. Opcionalmente, las partículas de biopolímero pueden disolverse para liberar los espermatozoides no humanos antes de la inseminación. Sin embargo, las partículas de biopolímero, según, todavía, otra forma de realización, pueden utilizarse conjuntamente, y en combinación con espermatozoides no humanos libres.

Los ejemplos siguientes no limitativos ilustran a continuación la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Inmovilización de los espermatozoides en el alginato

Materiales y Métodos

Materiales

Se utilizan las siguientes sustancias químicas: $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaCl , y citrato sódico, obtenidos a partir de Riedel de Haën (Seelze, Alemania); monohidrato de glucosa, de Norsk Medisinaldepot (Oslo, Noruega); alginato sódico (PROTANAL LF 10/60), proporcionado por FMC Biopolymer A/S (Drammen, Noruega).

Origen de los espermatozoides

Los espermatozoides bovinos se recogieron en la instalación Geno en Hallsteingård, en Trondheim, Noruega. Los espermatozoides de jabalíes se recogieron en las instalaciones de Norsvin en Hamar, Noruega. Los espermatozoides bovinos se diluyeron 1+2 en los extensores lácteos poco después de la eyaculación. Los espermatozoides de jabalíes se diluyeron 1+4 en TRI X-CELL™ (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, Francia). Ni esta dilución ni la selección de los tampones de dilución es crítica para el procedimiento de inmovilización o para la supervivencia a largo plazo de los espermatozoides después de la inmovilización, pero se lleva a cabo meramente para facilitar el almacenamiento, hasta que los espermatozoides puedan procesarse ulteriormente.

Soluciones tampón

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo IVT modificado: glucosa 3 g l^{-1} , citrato sódico 20 g l^{-1} , NaHCO_3 2,1 g l^{-1} , NaCl 1,16 g l^{-1} , EDTA 3 g l^{-1} , pH 7,35, BTS (con 3 mM Ca): glucosa 37 g l^{-1} , CaCl_2 0,44 g l^{-1} , citrato sódico 4,5 g l^{-1} , NaHCO_3 1,25 g l^{-1} , EDTA 1,25 g l^{-1} , KCl 0,74 g l^{-1} , Neomicina 1 g l^{-1} , pH 7,2. Solución gelificante de perlas: CaCl_2 7,3 g l^{-1} , NaCl 5,96 g l^{-1} , extensor lácteo: 110 g l^{-1} de leche desnatada Molico, yema de huevo 120 ml l^{-1} , estreptomycin 6,25 g l^{-1} , penicilina 1,5 mill I.E l^{-1} .

Inmovilización celular

Las células espermatozoides se cultivan en las instalaciones de Geno o Norsvir y de diluyeron tal como se ha descrito anteriormente. Antes de la inmovilización los espermatozoides se concentraron mediante centrifugación (800 g, 20 minutos, 20°C). La cantidad de sobrenadante que se eliminó en cada baño depende de la concentración deseada de espermatozoides en las perlas finalmente obtenidas. Después de la remoción del sobrenadante en exceso, el sedimento celular se volvió a suspender suavemente mediante agitación moderada. La suspensión celular se mezcló suavemente con una solución estéril al 6% (peso/volumen) de alginato sódico. Ésta se añadió en una proporción volumétrica de 2 partes de suspensión celular a 1 parte de solución de alginato (se han investigado un gran número de distintas combinaciones de concentración de alginato, proporciones volumétricas de solución de alginato y suspensiones celulares. En la presente memoria se proporcionan valores y procedimientos típicos).

La mezcla de alginato y células se añade gota a gota a la solución gelificante de las perlas, (véase anteriormente). Para producir perlas con un diámetro de 3 mm, se añadió la solución mediante la punta de jeringuillas con un diámetro interno de 0,5 mm. Para obtener perlas con diámetros más pequeños (por debajo de menos de 1 mm de diámetro), se utiliza un sistema basado en la utilización de una corriente de aire, para limitar el tamaño de las gotitas que se forman sobre las agujas. Se utiliza el cloruro sódico en la solución gelificante para asegurar una concentración homogénea del polisacárido a través de las perlas (Smidsrød, O. and Skjåk-Bræk, G. (1990) Alginate immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology 8, 71-78). Para limitar la cantidad de Ca^{2+} en las perlas, éstas se agitan no más de 8 minutos en la solución gelificante de las perlas. El procedimiento completo de inmovilización se realiza a temperaturas ambiente.

Almacenamiento de espermatozoides inmovilizados *in vitro* a temperatura ambiente

Un objetivo de procedimiento de inmovilización es alargar el tiempo en el que los espermatozoides pueden almacenarse antes de la inseminación. Se llevaron a cabo entonces experimentos en los que los espermatozoides experimentales que se describen a continuación se almacenan *in vitro* a temperatura ambiente en soluciones tampón. En todos los experimentos se incluyen muestras de referencia con espermatozoides no inmovilizados de la misma eyaculación. La calidad de los espermatozoides se evalúa midiendo la motilidad a distintos tiempos durante

el período de almacenamiento. En cada momento temporal, se analizan las muestras, y la movilidad de los espermatozoides inmovilizados y la de las muestras de control se registran. Se han investigado diversas combinaciones de volúmenes de almacenamiento y de densidades celulares para optimizar el sistema experimental (datos no representados). Las condiciones son típicas, y se utilizaron en los experimentos de los que se informa a continuación.

En los experimentos con espermatozoides bovinos, unas perlas de aproximadamente 2 ml con espermatozoides inmovilizados se transfirieron a tubos de centrifuga de 13 ml y se añadió una solución de extensores lácteos con una proporción volumétrica de 1 + 2. Las muestras de control con espermatozoides suspendidos libremente se prepararon llevando a cabo una dilución total de 1 + 15 en tubos de centrifuga de 13 ml (en todos los tubos se utiliza un volumen de aproximadamente 6 ml). Se ha demostrado, en experimentos previos que esta solución es prácticamente óptima para sostener la movilidad durante el almacenamiento en las muestras de referencia (datos no representados).

En experimentos con espermatozoides de jabalí, los espermatozoides se almacenaron a 18°C en BTS (con 3 mM Ca). En los experimentos de los que se informa a continuación, las muestras de control se diluyeron 1 + 10 en todos los experimentos, proporcionando un volumen total de 20 en tubos de centrifuga de 50 ml (esta dilución se ha mostrado previamente óptima para sostener la movilidad durante los almacenamientos). Las perlas conteniendo espermatozoides inmovilizados se transfirieron a tubos de centrifuga de 50 ml, añadiéndose BTS (con 3 mM de CaCl_2) en una proporción de 1 + 3. Las perlas que contenían espermatozoides inmovilizados se enjugaron con la solución de almacenamiento antes de la transferencia a la solución de almacenamiento.

Almacenamiento de los espermatozoides inmovilizados a 37°C

Para evaluar la supervivencia de los espermatozoides a temperaturas fisiológicas, se registró la movilidad de los espermatozoides durante su almacenamiento a 37°C. Los espermatozoides bovinos se transfirieron a una solución tampón de forma previa a los experimentos de almacenamiento a 37°C. Tal como se describe anteriormente, las muestras de referencia de cada eyaculado se incluyeron en cada experimento. Los ensayos se llevaron a cabo en tubos de centrifuga de 13 ml, con un volumen total de 8 ml en cada tubo. Las muestras de referencia se diluyeron 1 + 4 en la solución de almacenamiento. Para los espermatozoides inmovilizados, 3 ml de espermatozoides conteniendo perlas, se añadieron a 6 ml de solución de tampón, y se guardaron en un tubo de centrifuga de 13 ml. Los espermatozoides de jabalí se trataron de forma similar, excepto porque se utilizó un BTS normal (con 3 mM Ca).

Evaluación de la motilidad

La motilidad de los espermatozoides se evalúa microscópicamente. Las muestras (típicamente de 1ml) se obtuvieron de los contenedores de almacenamiento y se transfirieron a tubo de ensayo Eppendorf de 1,5 ml. A éstos se les permitió precalentarse durante por lo menos 15 minutos en un bloque térmico a 37°C antes de evaluarlos. Cuando se fue a realizar la medición, 2,5 µl de la muestra se añadieron a un portaobjetos microscópico precalentado, que se inspeccionó inmediatamente utilizando un microscopio óptico. El número de espermatozoides móviles en cada muestra se estimó próximo al 5%. El operador, si era prácticamente posible, no conoció la identidad de la muestra durante la evaluación.

Los espermatozoides inmovilizados deben liberarse de las perlas antes de la evaluación de la motilidad. Para disolver las perlas de alginato, una parte de éstas se añadió a tres partes de solución de IVT en un tubo para centrifugación de 13 ml. Estos tubos se situaron entonces en un volcador y se dejó que se mezclaran durante aproximadamente 30 minutos, antes de llevar a cabo la evaluación.

Resultados y discusión

Supervivencia de los espermatozoides inmovilizados

En la figura 1 se muestran datos de los experimentos con almacenamiento de espermatozoides en muestras de referencia (con espermatozoides no inmovilizados y en muestras con espermatozoides inmovilizados) para espermatozoides tanto bovinos como de jabalíes. Para los espermatozoides de jabalíes, se muestran datos de 2 distintos tipos de perlas. La razón de esto es que el tipo de partícula debe ser menor de 1 mm, para utilizar perlas para la inseminación intrauterina con el equipo existente disponible.

Como puede apreciarse a partir de los datos presentados en la figura 1 los espermatozoides inmovilizados parecen presentar una movilidad algo más baja que los espermatozoides en las muestras de referencia, escasamente después de la inmovilización. Esta diferencia en la movilidad puede estar causada tanto por el procedimiento de inmovilización como por el de disolución, pues las perlas que contienen espermatozoides inmovilizados deben disolverse antes de la evaluación de la movilidad. No es necesario, sin embargo, disolver las perlas antes de la inseminación, pues éstas se disolverán lentamente en condiciones fisiológicas (datos no representados).

La diferencia en la movilidad entre las muestras de referencia y los espermatozoides inmovilizados se reduce

durante el período de almacenamiento, pues la movilidad en las muestras de referencia parece disminuir más rápido que en las muestras inmovilizadas, especialmente para los espermatozoides de jabalí. Para los espermatozoides de jabalí inmovilizados, se registró una movilidad del 50% aproximadamente después de 5 días de almacenamiento en las perlas con 3 mm de diámetro en este experimento particular. En este momento se registró movilidad del 10% en las muestras de referencia. Estos resultados indican que la inmovilización influye a las células o al ambiente local de las células, de una forma que es beneficiosa por su capacidad para tolerar el almacenamiento *in vitro* a 18°C.

Para los espermatozoides bovinos, no existe una diferencia significativa en la movilidad entre las muestras de referencia y los espermatozoides inmovilizados en el último período del experimento que se muestran.

Una optimización posterior de las condiciones del almacenamiento y del procedimiento de inmovilización puede, sin embargo, mejorar los tiempos de almacenamiento de los espermatozoides bovinos inmovilizados. Las mediciones del consumo de glucosa y de la producción de lactato de los espermatozoides bovinos inmovilizados y de los no inmovilizados con referencia a las muestras, indican que los espermatozoides que se almacenan en el interior de una red de gel de alginato cálcico, poseen una tasa reducida del metabolismo (c.f. Ejemplo 2).

Para evaluar si los espermatozoides inmovilizados sobrevivirán a las condiciones fisiológicas, es decir, las condiciones en las que la actividad de los espermatozoides deberían estar al máximo, se llevaron a cabo experimentos de almacenamiento a una temperatura de 37°C. Los datos de los experimentos con un almacenamiento *in vitro* de espermatozoides bovinos y de jabalí, durante el almacenamiento a 37°C, se muestran en la figura 2.

Tal como se aprecia en los experimentos con un almacenamiento *in vitro* a temperaturas ambientales, existe una diferencia en la movilidad entre las muestras de referencia y las muestras con espermatozoides inmovilizados con alginato, después de la preparación de las muestras. Sin embargo, tanto para los espermatozoides bovinos como para los de jabalí, la movilidad disminuye rápidamente medianamente de forma rápida en las muestras de referencia con espermatozoides no inmovilizados durante el almacenamiento a 37°C. En las muestras con espermatozoides inmovilizados, la movilidad disminuye más lentamente de modo significativo. Después de 15 horas de almacenamiento *in vitro* a 37°C, las movilidades de los espermatozoides de jabalí, en ambos tamaños de las perlas, son todavía superiores a 50%. De hecho, la movilidad es todavía del 30% aproximadamente después de 60 horas de almacenamiento a 37°C en las perlas con 3 mm de diámetro.

Para los espermatozoides bovinos, la movilidad parece disminuir más rápidamente que para la de los espermatozoides de jabalí; en este sistema experimental. Sin embargo, como con los espermatozoides de jabalí, existe una diferencia significativa entre las velocidades de disminución de la velocidad durante el almacenamiento en este experimento para los espermatozoides bovinos. Después de 24 horas de almacenamiento, los espermatozoides bovinos inmovilizados presentan todavía una movilidad del 45%, mientras no existe registro de movilidad en las muestras de referencia.

Debe considerarse que los datos que se presentan en la figura 2, se obtienen utilizando un sistema experimental artificial, que no representa la situación *in vivo* en el animal hembra. Los datos que se presentan en la figura 2 indican, sin embargo, que tanto los espermatozoides bovinos como los de jabalí, sobreviven y pueden retener medianamente la movilidad durante largos períodos cuando son inmovilizados en una red de gel de alginato cálcico incluso a temperatura fisiológica. Los datos pueden también indicar que la inmovilización con las redes géllicas de alginato cálcico pueden utilizarse para aguantar la movilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento a temperaturas fisiológicas. Esto puede ser especialmente importante, pues el tiempo de inseminación es crítico para obtener resultados de una buena fertilización. El tiempo de inseminación es crítico debido a que los espermatozoides tienen un tiempo limitado de supervivencia después de la inseminación. Los resultados pueden por tanto indicar que la inmovilización de los espermatozoides combinada con una liberación controlada después de la inseminación, pueden utilizarse para alargar el período de tiempo entre la inseminación y la fertilización.

Ensayos de inseminación

Los ensayos de inseminación se llevaron a cabo en un total de 9 cerdas en una manada. Las cerdas estaban en espera de una eliminación directamente del destete de una camada de lechones anterior, pero la eliminación se aplazó hasta aproximadamente 4 semanas después de la inseminación.

En el matadero, los órganos reproductores se recogieron directamente después de la evisceración, y se examinaron en 15 minutos. El número de cuerpos lúteos en los ovarios y el número de embriones (si es que había alguno) en los cuernos uterinos se contaron y se registraron. La interferencia, en este estadio temprano de la preñez, la posibilidad de observar cada embrión presente (aunque esté degenerado), es relativamente alta. Observando el número de crías nacidas a plazo completo, se tiene el alto riesgo de perder un alto porcentaje de embriones, ya que cualquier fruto de la concepción y embrión muerto antes de la osificación, se reabsorberá por el sistema materno, y al final, no se apreciarán residuos. A lo sumo, 30% de los óvulos de cerda fertilizados pueden morir y desaparecer entre la concepción y la osificación. En nuestros ensayos, puede calcularse para cada cerda una buena estimación de la tasa de fecundación contando el número de embriones y el número de cuerpos lúteos a las 4 semanas.

La sincronización de las inseminaciones varió desde la normal a la de un día anterior al normal, habiéndose llevado a cabo inseminaciones tanto únicas como dobles. Los resultados de estos ensayos de inseminación se muestran en la tabla 1.

5 **Tabla 1: Números de cerdas inseminadas, tasas de preñez y fecundación (en animales preñadas), con los ensayos de inseminación.**

Procedimiento	Cerdas #	Preñadas (%)	Tasa de fecundación (%)
Esperma inseminado, día 1 ¹ + 2	5	4 (80%)	57%
Esperma inseminado re-disuelto día 1 + 2	4	2 (50%)	66%

10 Día 1¹= día de recogida de espermatozoides

Los ensayos de inseminación se realizaron también con espermatozoides bovinos. Estos ensayos son menos fáciles de cuantificar, pues no están disponibles manadas grandes de ensayo. Estos ensayos se realizaron en una manada con 20 terneras disponibles. Las terneras presentaban un estro sincronizado antes de la inseminación. Se alcanzaron buenas tasas de fecundación utilizando espermatozoides bovinos inmovilizados. En el estudio, 6 de las 12 terneras inseminadas con espermatozoides inmovilizados que se almacenaron 24 horas, fueron fertilizadas, confirmado por el control de preñez.

20 Los espermatozoides se inmovilizaron en alginato, almacenándose inmovilizados a temperatura ambiente durante distintos períodos, y disolviéndose o no una vez inseminados. La sincronización de las inseminaciones de las inseminaciones varió entre normal y un día anterior a éste, realizándose sólo inseminaciones únicas. Las animales preñadas se confirmaron mediante examen rectal 5-7 semanas después de la inseminación. Los resultados de estos ensayos se muestran en la tabla 2.

25 **Tabla 2: Ensayos de inseminación en el ganado: procedimiento utilizado, número de terneras inseminadas y tasa de preñez.**

Nº de ensayo	Procedimiento	# terneras	Preñadas (%)
1	Esperma inmovilizado, almacenado durante 24 horas a 18°C, disuelto inmediatamente antes de inseminación	12	6 (50%)
2	Esperma inmovilizado, almacenado durante 24 horas a 18°C, inseminado y no disuelto un día antes que el normal con relación al estro	3	1 (33,3%)
3	Esperma inmovilizado, guardado durante 48 horas a 18°C, disuelto inmediatamente antes de inseminación	5	4 (80%)

30 Estos datos muestran que los espermatozoides inmovilizados en perlas de alginato de calcio no sólo conservan la motilidad sino que también conservan todas las propiedades funcionales necesarias para la fertilización. Así, Geno y Norsvin han demostrado que los espermatozoides inmovilizados en geles de alginato cálcico pueden utilizarse para inseminación, pudiendo provocar la fecundación tanto del ganado como de los cerdos.

35 **Ejemplo 2. Consumo energético de los espermatozoides inmovilizados**

Sin limitarse a una teoría específica se cree que la inmovilización de los espermatozoides conduce a un consumo energético reducido por parte de los espermatozoides, y que éste es beneficioso con respecto a la duración y a su capacidad de fertilización.

40 Así, para investigar esta teoría, espermatozoides bovinos se inmovilizaron en perlas de alginato a una concentración de aproximadamente de 150×10^6 espermatozoides/ml, añadiéndose a 2 veces el volumen de la perla de un tampón de dilución lácteo. Las muestras de referencia con espermatozoides suspendidos libremente se prepararon a partir de la misma eyaculación que contenía la misma concentración total de espermatozoides por volumen total en un tampón de dilución láctea. Las mezclas se convirtieron en anaeróbicas mediante enjuague con N₂ antes de guardarlas a 20°C. Se tomaron muestras del tampón de dilución láctea durante el período de almacenamiento, midiéndose mediante HPLC las producciones de lactato a partir de los espermatozoides en las muestras. Los resultados se presentan en la tabla 3:

Tabla 3: Producción de lactato de los espermatozoides inmovilizados y suspendidos libremente durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Los valores se proporcionan en nanomoles de lactato producido por 350 mill espermatozoides.

Tiempo de almacenamiento (días)	Espermatozoides inmovilizados	Muestras de referencia
1	4,21	16,1
2	6,00	20,6
3	6,90	22,1

Ejemplo 3: Inmovilización de semen de Silver fox (vulpes vulpes)

Un semen mezclado de buena calidad de tres machos adultos silver fox (*Vulpes vulpes*), se diluyó en extensa EDTA a 228×10^6 células espermáticas por ml, transportándose al laboratorio. Tres horas después de la recogida y dilución, se centrífugo a 2.000 rpm durante 10 minutos, una parte alícuota del semen. El sedimento se mezcló con alginato (LF 10/60) y se formaron las perlas tal como se describe en la solicitud de patente. Las perlas se guardaron en Bilady modificado a 18°C. El semen restante se guardó en EDTA a 18°C, como control.

Las perlas se disolvieron después de 48 horas. Tanto el semen disuelto como el de control se calentaron a 35°C durante 20 minutos antes de que la evaluación de la motilidad como porcentaje móvil de esperma se realizara mediante microscopia de fase con un aumento de 10 x y 25 x sobre una placa calentada a 38°C.

Tabla 4: Movilidad del semen almacenado inmovilizado y no inmovilizado (control) del silver fox.

	Movilidad a la llegada	Movilidad después de almacenamiento durante 48 horas
Semen de control	75%	45-50%
Semen inmovilizado (después de disuelto)		55-60%

Ejemplo 4. Crías recién nacidas a término después de inseminación única intrauterina con semen de jabalíes inmovilizado en alginato.

Un semen mezclado de 3 jabalíes adultos se trató según la presente invención y las perlas se utilizaron para la inseminación intrauterina de una cerda que más tarde dará luz a cerdos después de una preñez a término. La cerda se había destetado de su camada el 8 de febrero de 2007 y se inseminó una vez con semen inmovilizado en perlas de alginato el 12 de febrero de 2007. La cerda dio a luz a 16 crías vivas el 10 de junio de 2007. No hubo crías mortinatos en la camada y todas ellas aparecieron normales en la inspección clínica.

Ejemplo 5: Inmovilización del semen de carnero en alginato

Un semen procedente de dos carneros AI se recogió con una vagina artificial, transportándose al laboratorio en los 10 minutos siguientes. El semen se diluyó 1 + 3 en un extensor basado en leche desnatada (Curtis PG, Forteach AD, Polge C. Survival of bull sperm frozen in milk diluents containing varying concentrations of glycerol and fructose. Proc IVth Int Congr Anim Reprod 1961; 3:952-956), antes de la adición de alginato, formándose perlas tal como se describe en la solicitud de patente 6B 0613288.0, ejemplo 1. Las perlas se guardaron en un extensor basado en leche desnatada a temperatura ambiente o a una de 5°C. Los espermatozoides inmovilizados se liberaron de las perlas antes de la evaluación de la movilidad como el porcentaje de células espermáticas móviles 24 y 48 horas después de la inmovilización. Debido a razones prácticas, en este estudio no se incluyeron controles. Sin embargo, los parámetros de viabilidad, incluyendo la movilidad, serán perjudicados durante el almacenamiento del semen líquido de los carneros a 5° o 20°C durante 30 horas (Paulenz H, Soderquist L, Perez-Pe R, Berg KA. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. Theriogenology 2002: 57(2): 823-36).

Tabla 5: Movilidad del semen inmovilizado de carneros almacenado a distintas temperaturas durante 24 y 48 horas

	Almacenamiento	Movilidad después de 24 horas	Movilidad después de 48 horas de almacenamiento
	Temperatura	Almacenamiento	
Carnero 1	5°C	75-85%	70-80%
	20°C	70-80%	65-75%
Carnero 2	5°C	75-85%	70-80%
	20°C	70-80%	65-75%

REIVINDICACIONES

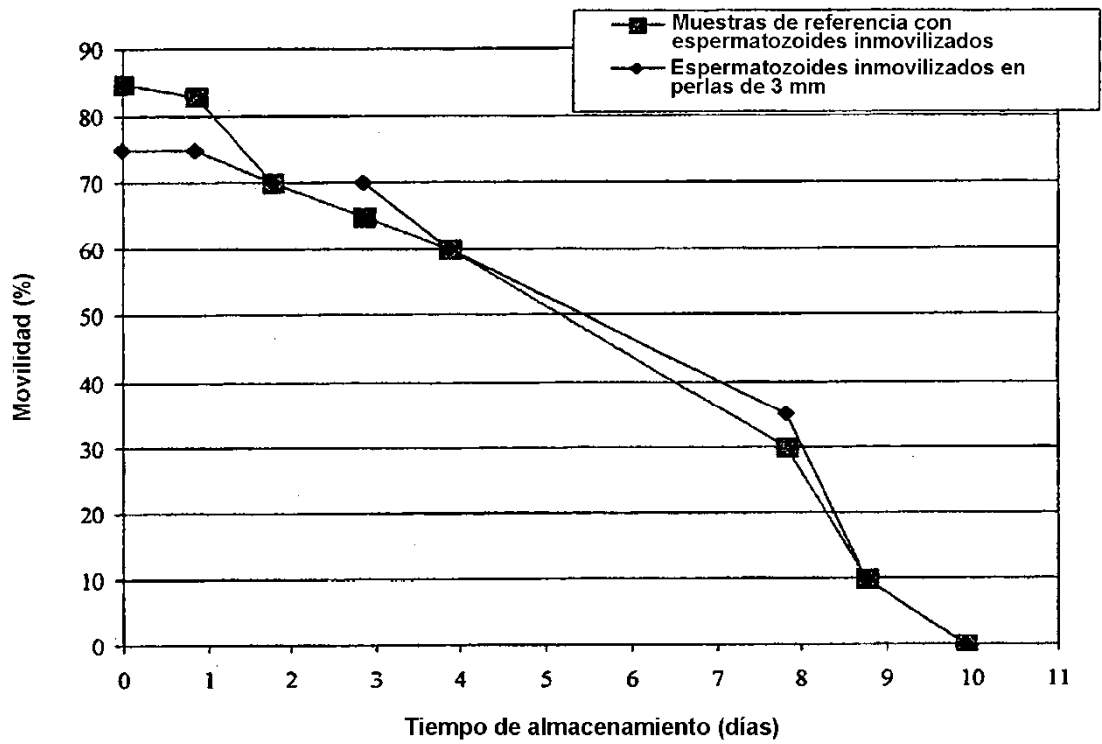
1. Partículas de biopolímero para la conservación de espermatozoides no humanos, en las que los espermatozoides no humanos están embebidos en una red de gel de biopolímero, y en las que el biopolímero que embebe los espermatozoides no humanos comprende alginato que es rico en ácido gulurónico.
2. Partículas según la reivindicación 1, en las que el biopolímero que embebe los espermatozoides comprende alginato cálcico.
3. Partículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en las que la concentración de alginato es de por lo menos 0,1%.
4. Partículas según la reivindicación 3, en las que la concentración de alginato es de entre por lo menos 0,1% y 6% de alginato.
5. Partículas según la reivindicación 4, en las que la concentración de alginato es de por lo menos 1%.
6. Partículas según la reivindicación 5, en las que la concentración de alginato es de por lo menos 2%.
7. Partículas según la reivindicación 3, en las que la concentración de alginato es de 6%.
8. Partículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que presentan una concentración de espermatozoides de por lo menos $0,1 \times 10^6$ espermatozoides/ml.
9. Partículas según la reivindicación 8, que presentan una concentración de espermatozoides de por lo menos 100×10^6 espermatozoides/ml.
10. Partículas según la reivindicación 8, que presentan una concentración de espermatozoides de por lo menos $2,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml.
11. Partículas según la reivindicación 10, en las que los espermatozoides están coembebidos con uno o más antioxidantes.
12. Partículas según la reivindicación 11, en las que el antioxidante es seleccionado de entre el grupo que consiste en piruvato, 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetra-metil-piperidina-1-oxil, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado.
13. Partículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en las que dicha partícula está revestida.
14. Partículas según la reivindicación 13, en las que el revestimiento se selecciona de entre el grupo que consiste en polilisina, quitosano, sulfato de celulosa, hidroxilpropilmetilcelulosa o cloruro de polidialildimetilamonio.
15. Partículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en las que los espermatozoides están además coembebidos con compuestos o agentes que son beneficiosos para la capacidad de fecundación y/o la salud animal.
16. Partículas según la reivindicación 15, en las que los espermatozoides están coembebidos con uno o más de los compuestos o agentes seleccionados de entre el grupo que consiste en extensores, crioprotectores, antibióticos, anticuerpos, antioxidantes, proteínas y hormonas.
17. Partículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en las que los espermatozoides proceden de un animal seleccionado de entre el grupo que consiste en cerdos, ganado bovino, caballos, ovejas, cabras, conejos, aves de corral, mascotas como perros con pedigrí, animales de peletería, animales acuáticos y especies animales en peligro de extinción.
18. Partículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en las que los espermatozoides están contenidos en líquido seminal.
19. Solución que comprende las partículas de biopolímero según la reivindicación 1 y una solución de almacenamiento, en la que la proporción solución de almacenamiento:partículas de biopolímero es de por lo menos entre 1:1 y 1:100.
20. Procedimiento para la preparación de las partículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que una mezcla de alginato que es rico en ácido gulurónico y espermatozoides no humanos se añade a una solución gelificante.
21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que la solución gelificante comprende uno o más de los iones

siguientes seleccionados de entre el grupo que consiste en calcio, sodio, bario, magnesio.

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21, en el que las partículas son tratadas además mediante deshidratación, crioconservación o liofilización.

Figura 1

A. Espermatozoides bovinos



B. Espermatozoides de jabalí

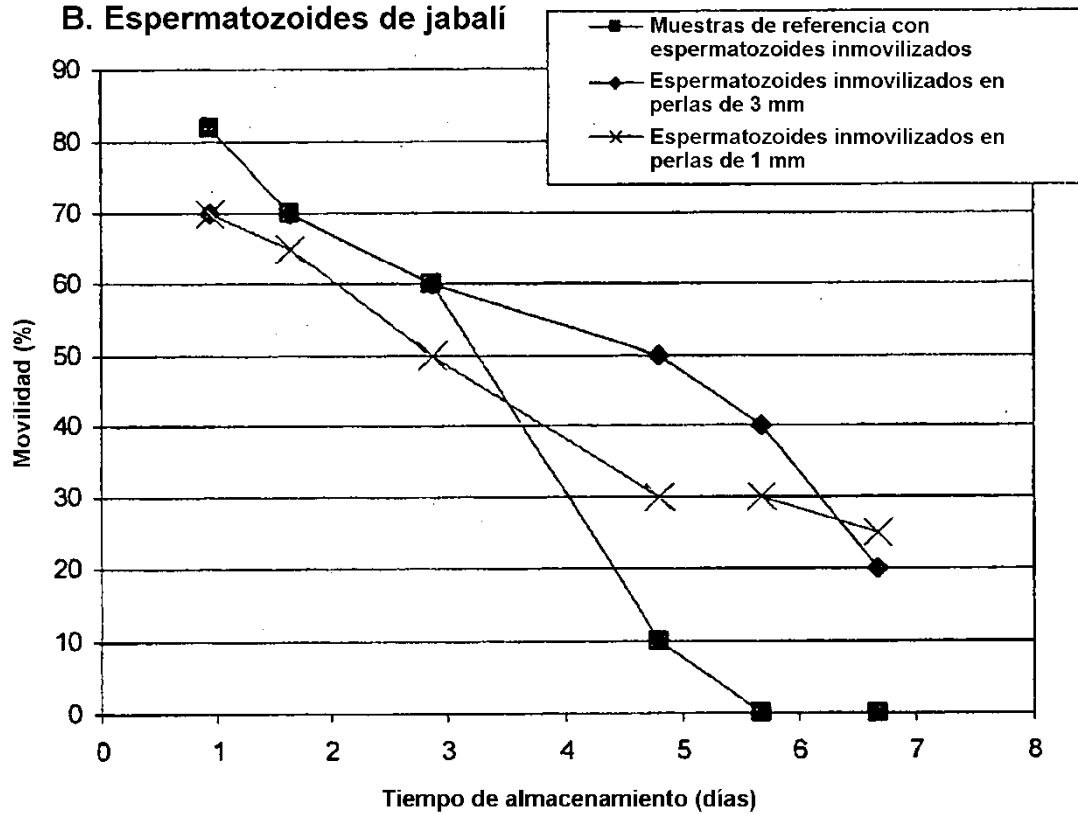


Figura 2

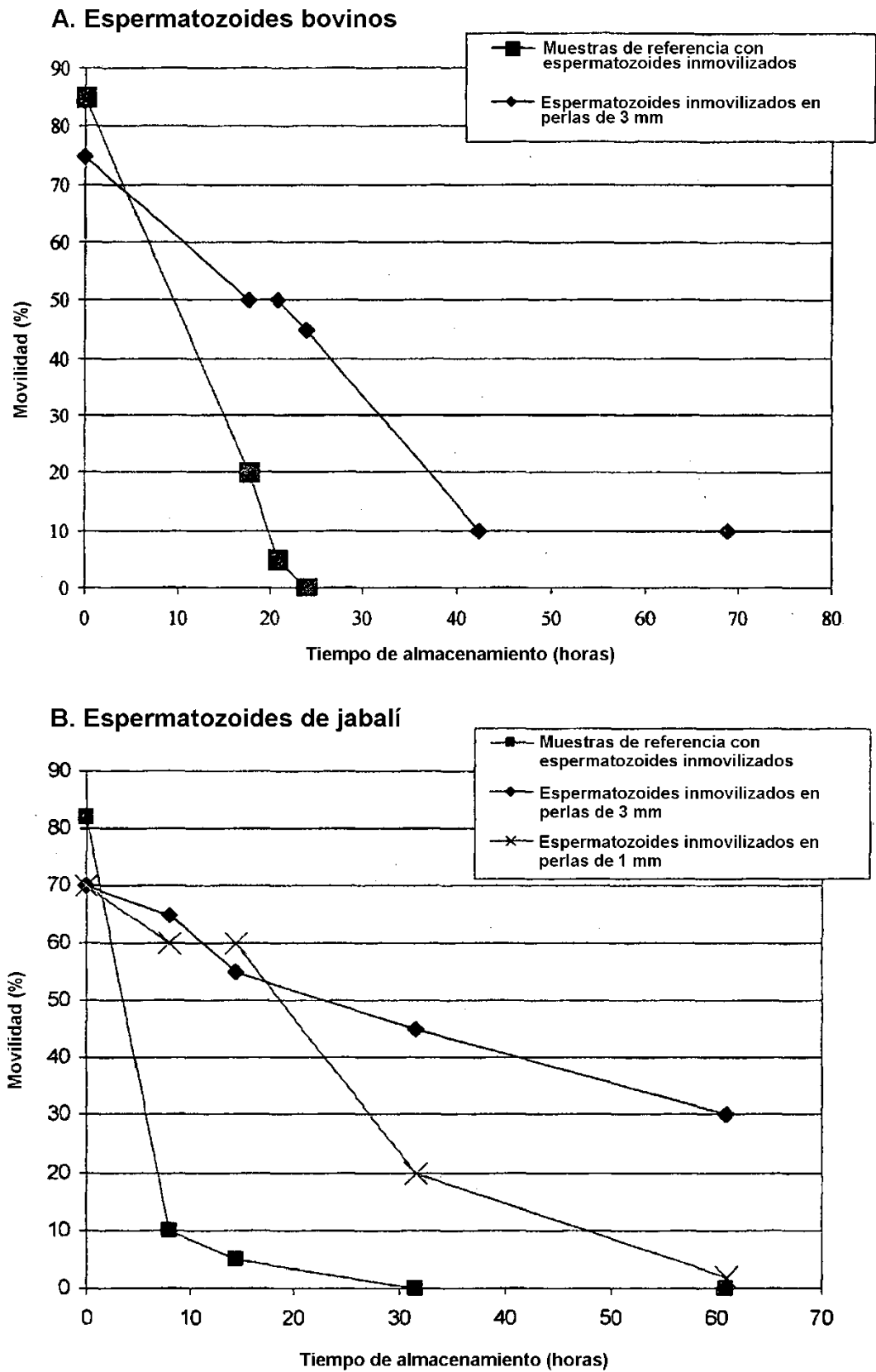


Figura 3

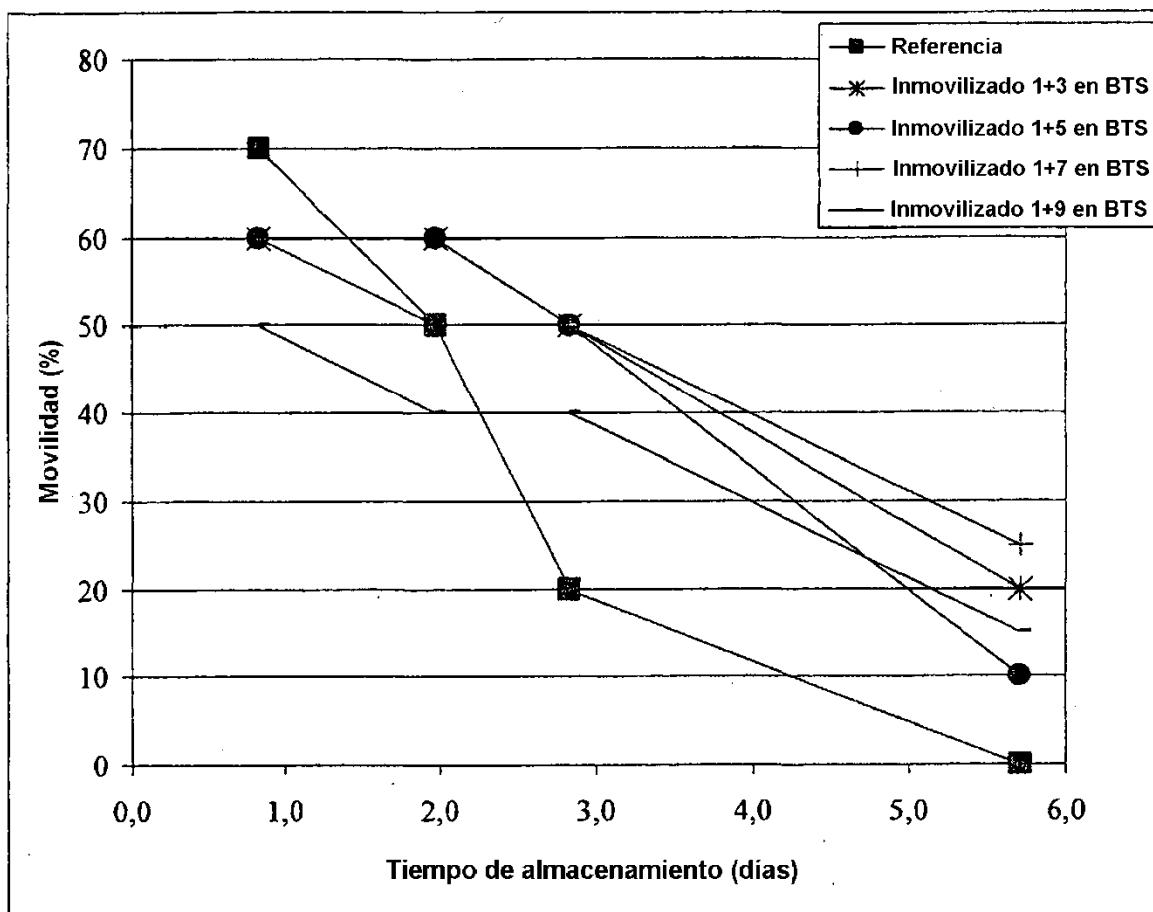


Figura 4

