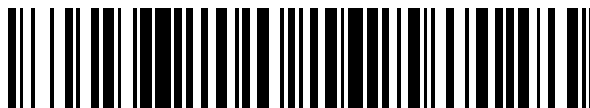


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 144**

21 Número de solicitud: 201400536

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

A01N 1/02 (2006.01)

G01N 33/18 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

07.07.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.01.2016

71 Solicitantes:

UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)

Campus Universitario s/n

36310 Vigo (Pontevedra) ES

72 Inventor/es:

BEIRAS GARCÍA-SABELL , Ricardo ;

BELLAS BEREIJO , Juan y

PAREDES ROSENDO , Estefanía

54 Título: **Procedimiento para la criopreservación de embriones de erizo de mar y bioensayo asociado**

57 Resumen:

Procedimiento para la criopreservación de embriones de erizo de mar y bioensayo asociado. El procedimiento se basa en el uso de un protocolo de criopreservación para blástulas de 8 horas de erizo de mar para poder almacenar en nitrógeno líquido embriones para su uso fuera de la temporada de reproducción natural de esta especie. Se ha desarrollado además, un bioensayo ecotoxicológico con embriones de erizo de mar criopreservados para la evaluación de la contaminación marina. El procedimiento objeto de esta patente permite el uso durante todo el año de embriones de erizo de mar tanto en bioensayos ecotoxicológicos como con aplicaciones en la industria de la acuicultura.

ES 2 556 144 A1

DESCRIPCIÓN**PROCEDIMIENTO PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES DE
ERIZO DE MAR Y BIOENSAYO ASOCIADO****Sector de la técnica**

El objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de criopreservación de
5 embriones de erizo de mar (*Paracentrotus lividus*) y su aplicación en un bioensayo. El
procedimiento se basa en el uso de un protocolo de criopreservación específicamente
diseñado para erizo de mar y este tipo celular (blástula de 8 horas) para poder almacenar
en nitrógeno líquido embriones para su uso fue de la temporada de reproducción natural
de esta especie. Protocolo de criopreservación de embriones de erizo de mar con
10 aplicaciones en investigación, acuicultura y ecotoxicología. Desarrollo de un bioensayo
con blástulas criopreservadas de erizo de mar para la evaluación de la contaminación
marina.

Estado de la técnica

Una gran variedad de organismos han sido criopreservados para su uso en biología
15 experimental, medicina, acuicultura e investigación. En particular, la criopreservación
de esperma y larvas de organismos marinos ha resultado de gran utilidad para el
desarrollo de la acuicultura en los últimos años. Sin embargo, la mayor parte de estos
estudios se han realizado con peces, y en menor medida con bivalvos como la ostra y el
mejillón (Sansone *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2005, Adams *et al.* 2004, Di Mateo *et al.*
20 2009, Adams *et al.* 2011), mientras que sólo se ha publicado información fragmentaria
sobre erizos de mar endémicos de la zona del Pacífico (Asahina y Takahashi 1979 ;
Gaknova *et al.* 1988 y Naidenko *et al.* 1991,1998; Barros *et al.* 1997 y Adams *et al.*
2006). Por otra parte, la aplicación de estas técnicas se ha basado fundamentalmente en
la criopreservación de esperma, y en menor grado de larvas, ya sea por la mayor
25 sencillez del procedimiento, o por la mayor resistencia de dichos estados de desarrollo.
Mientras que, debido a la dificultad del proceso de criopreservación de estadios
tempranos de desarrollo por su gran sensibilidad, la bibliografía publicada sobre el éxito
de criopreservación de embriones tempranos de erizo de mar (desde ovocitos recién
fertilizados a gástrulas) es mínima (Naidenko *et al.* 1991, Paredes y Bellas 2009, Bellas
30 y Paredes 2011), y es precisamente la sensibilidad de estos estadios tempranos lo que

los convierte en los estados de desarrollo más sensibles a la contaminación y por tanto de interés en estudios ambientales.

En acuicultura la criopreservación de embriones tempranos (de estructura más simple) supondría una alternativa a la criopreservación de estadios larvarios más complejos que suelen presentar daños/anormalidades en sus estructuras tras el proceso de criopreservación. El desarrollo de estos protocolos de criopreservación es específico para las diferentes clases de organismos (radicalmente diferente para mamíferos, peces o invertebrados) y dentro de un mismo tipo de organismo es específico para cada especie y cada tipo de estado de desarrollo.

- 5
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
- No existen trabajos que hayan abordado la criopreservación de gametos, embriones o larvas del erizo *Paracentrotus lividus*, más allá de aquellos publicados por nuestro grupo (Paredes y Bellas, 2009, Bellas y Paredes, 2011). Dichos estudios han abordado de forma preliminar alguna de las tareas iniciales en los estudios de criopreservación, como el establecimiento de concentraciones adecuadas de agentes crioprotectores y de sus combinaciones para diferentes estados embrionarios tempranos (Paredes y Bellas, 2009), y el estudio de factores que afectan al proceso de criopreservación, como las tasas de congelación, el proceso de ‘seeding’, o la inmersión en nitrógeno líquido (Bellas y Paredes, 2011). Sin embargo, nunca ha sido publicado el proceso completo de criopreservación para el que se quiere obtener esta patente.
- El erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), es un erizo regular de gran tamaño (hasta 7 cm de diámetro), que presenta una distribución amplia a lo largo del Mar Mediterráneo, las costas atlánticas europeas, noroeste de Rusia, Islandia, Marruecos y las Islas canarias (Hayward y Ryland, 1990; Boudouresque y Verlaque, 2007). Se trata de un erizo comestible de gran relevancia económica, pues es explotado en algunos países (p.ej. España, Francia, Italia, Irlanda, Portugal, Croacia) por sus gónadas comestibles, que son muy apreciadas en gastronomía (Boudouresque y Verlaque, 2007). Además, suele desempeñar un importante papel ecológico en el funcionamiento, en la dinámica y en la estructura de los asentamientos bentónicos (Hayward y Ryland, 1990; Boudouresque y Verlaque, 2007).
- Los bioensayos embrio-larvarios con invertebrados marinos han sido utilizados de rutina para la evaluación y seguimiento de la contaminación marina en todo el mundo

durante las últimas décadas (e.g. His *et al.* 1999, Kobayashi 1995, Beiras *et al.* 2003, Bellas 2008a, Durán and Beiras 2010), consisten en la exposición de un grupo representativo de organismo a un rango de concentraciones de un compuesto químico y registrar/cuantificar los efectos a lo largo de cierto periodo de tiempo. (Hoffman *et al.* 5 1995, Wright and Welbourn 2002). La aplicación de estas técnicas biológicas con éxito a nivel mundial ha permitido reconocer no solo sus beneficios si no también problemas asociados que están limitando la utilización de estas técnicas: la estacionalidad de la reproducción de las especies test produce una corta disponibilidad temporal de material biológico de calidad para los bioensayos (His *et al.* 1999). El diseño de un bioensayo 10 con embriones criopreservados, que pueden mantenerse almacenados en criobancos a lo largo del año, asegura la accesibilidad a material biológico de calidad de forma continua.

No tenemos conocimiento sobre ninguna patente sobre la criopreservación del erizo de mar *P. lividus*, ni de ninguna otra especie de erizo, ni tampoco de la aplicación de 15 embriones criopreservados de esta especie a técnicas ecotoxicológicas o en acuicultura.

Descripción de la invención

El procedimiento de la presente invención de criopreservación de embriones tempranos (de estructura más simple) supone una alternativa a la criopreservación de estadios 20 larvarios más complejos que suelen presentar daños/anormalidades en sus estructuras tras el proceso de criopreservación. El uso de embriones tempranos criopreservados es una opción válida a la criopreservación de los gametos por separado, ya que aunque la criopreservación de espermatozoides se ha logrado satisfactoriamente, la criopreservación de ovocitos aún permanece sin desarrollar. La posibilidad de la conservación de material 25 biológico de calidad fuera de la temporada de reproducción natural de una especie abre tanto la posibilidad de ampliar su uso a lo largo de todo el año como la posibilidad de su uso en lugares que anteriormente no tenían acceso a este material biológico por encontrarse lejos de la costa o por no tener las instalaciones necesarias para el mantenimiento de los organismos adultos.

El proceso cuya patente se aborda aquí está desarrollado en su totalidad, desde la obtención de las blástulas de erizo de mar, la composición y concentración de crioprotector, la metodología de adición del crioprotector, el proceso de criopreservación, temperatura de “seeding”, hasta el proceso de descongelación y estudio de viabilidad. A pesar de que el desarrollo de un protocolo de criopreservación es específico de una especie y de un tipo celular concreto, hay estudios (Paredes *et al.* 2013) que sugieren que podría darse la posibilidad que este protocolo diseñado para blástulas de *P. lividus* pudiese utilizarse para tipos celulares similares (blástulas y gástrulas) de otros erizos de mar (eg. *Strongylocentrotus spp.*, *Tetrapigus spp.*, *Evechinus spp.* *Hemicentrotus spp.*). Se trata de un procedimiento novedoso en esta especie, con una amplia aplicación en investigación (reproducción, ecotoxicología, criopreservación, acuicultura) como industrial por su sinergia con otras tecnologías y aplicaciones en acuicultura y *monitoring* medioambiental.

El procedimiento de un bioensayo con embriones criopreservados de erizo de mar mediante el protocolo de criopreservación previamente descrito, que se aborda aquí es una alternativa al bioensayo embrio-larvario de erizo de mar estándar que ya es ampliamente utilizado para la evaluación y seguimiento de la contaminación marina, pero que está sujeto a restricciones temporales debido a la estacionalidad de la reproducción de los organismos.

El bioensayo consiste en descongelar blástulas criopreservadas de erizo y una vez que se han eliminado los crioprotectores repartirlas en viales con diferentes concentraciones de un compuesto químico. Tras un periodo de incubación, el contenido de los viales se fija con formol al 40% para medir la respuesta a las dosis de contaminante en las larvas resultantes. Se calcula la Concentración efectiva 50 (CE₅₀) como la concentración que induce una respuesta del 50% en los organismos expuestos. El uso de blástulas criopreservadas de erizo permite el acceso a material biológico sin restricciones estacionales y es más sensible que el bioensayo embrio-larvario estándar lo cual nos permite detectar concentraciones más bajas de contaminantes.

Breve descripción de las figuras

Para facilitar la comprensión de la invención, se anexan las siguientes figuras representativas:

5 Tabla 1. Descripción de los volúmenes de adición y retirada de los agentes crioprotectores en 15 y 12 pasos equimolares respectivamente (con cada paso de adición la concentración de crioprotector en los viales se incrementa en 0.1M, mientras que con cada paso de dilución la concentración de crioprotectores de la muestra se reduce en 0.125M).

10 Figura 1. Crecimiento de larvas *pluteus* de 4 brazos (96 horas de incubación a 20°C sin alimento) a partir de embriones criopreservados en diferentes meses del año.

Figura 2. Porcentaje de asentamiento larvario de larvas incubadas durante 20 días procedentes de embriones criopreservados comparados con controles frescos para 2 parejas de erizos diferentes.

15 Figura 3. Inhibición del crecimiento larvario como resultado del bioensayo de toxicidad del Plomo con embriones criopreservados (línea negra) en comparación con el bioensayo embrio-larvario estándar (línea gris) para una misma pareja de erizo de mar, n= 35.

Descripción detallada de la invención

20 Como un ejemplo de realización preferida se describe el procedimiento de criopreservación de embriones de erizo de mar de *Paracentrotus lividus*:

1.- Se obtienen los gametos directamente de las gónadas de una pareja de erizos de mar en época reproductiva con unas pipetas. Se realiza una fertilización in vitro añadiendo unos microlitros de esperma móvil a una solución de ovocitos en una probeta. Se agita cuidadosamente unos segundos para favorecer la fertilización. Las blástulas se obtienen
25 por la incubación de los ovocitos fertilizados durante 8 horas en oscuridad a la temperatura de 20 °C.

2.- Elaboración de los agentes crioprotectores: La solución crioprotectora utilizada ha sido específicamente diseñada mediante pruebas de toxicidad y eficiencia crioprotectora

para este tipo celular y especie. La solución crioprotectora consta de Dimetil sulfoxido 1.5M y Trealosa 0.04M de concentración final en viales de congelación preparados en una a disolución al doble de concentración final deseada en agua de mar artificial (ASW) a temperatura ambiente (19 ± 1 °C).

- 5 3.- Metodología de adición de los agentes crioprotectores: Se extraen las blástulas de los tanques utilizados para el cultivo usando filtración en húmedo con filtro con maya de 20 micrómetros. Se transfiere 1 ml de suspensión de blástulas (de densidad deseada) a los viales de criopreservación (volumen vial 2 mL). Se añaden los agentes crioprotectores en 15 pasos equimolares (cada adición incrementa en 0.1M la concentración en los
- 10 viales) de 1 minuto (volumenes detallados en tabla 1). Una vez finalizada la adición de los agentes crioprotectores los viales están listos para iniciar la criopreservación (Volumen final son 2 mL, dilución 1:1).

- 15 Tabla 1. Descripción de los volúmenes de adición y retirada de los agentes crioprotectores en 15 y 12 pasos equimolares respectivamente (con cada paso la concentración de crioprotector en los viales se incrementa en 0.1 M, mientras que con cada paso de dilución la concentración de crioprotectores en la muestra se reduce en 0.125 M).

Paso	Adición de crioprotectores (μ L de solución crioprotectora)	Dilución de crioprotectores (μ L de ASW)
1	35	143
2	37	165
3	40	193
4	43	228
5	46	273
6	50	334
7	55	417
8	60	536
9	65	715
10	72	1000
11	79	1500
12	88	2500
13	98	
14	111	
15	125	
Tiempo total	15 minutos	12 minutos

4.- Protocolo de criopreservación: Los viales se introducen en una criocámara programable estilo *Cryologic Pty. Ltd.* Australia y se sigue el protocolo de criopreservación. La rampa de congelación se programa para comenzar con una pausa a 4 °C durante 2 min, enfriamiento a una tasa de 1 °C min⁻¹ hasta -12 °C. En ese punto se hace el “seeding” durante una pausa de 2 min seguida de una tasa de congelación de 1 °C min⁻¹ hasta alcanzar los - 80 °C. Tras una pausa final de 2 minutos los viales se sacan rápidamente de la criocámara y se introducen en nitrógeno líquido.

5.- El “seeding” consta de un golpecito seco con un objeto metálico y frío que se da a los viales cuando alcanzan los -12 °C para favorecer la congelación de la solución crioprotectora que contiene los embriones, en todos los viales en la misma temperatura. Este paso tiene que hacerse con rapidez para evitar fluctuaciones en la temperatura de los viales.

5.- El almacenamiento de los viales se hace en nitrógeno líquido a -196 °C.

6.- La descongelación de los viales se hace por inmersión en un baño de agua a 17 ± 1 °C (1.5-2 minutos). Una vez descongelada la solución se transfiere a unos viales de 20 mL donde se procede a la dilución de los crioprotectores.

7.- Retirada de los agentes crioprotectores: la dilución de los crioprotectores se realiza con la adición equimolar en 12 pasos de ASW (durante la dilución cada paso reduce la concentración de crioprotectores en la muestra en 0.125 M) a temperatura ambiente 19 ± 1 °C (tabla 1). Una vez terminada la dilución de los crioprotectores se filtran los embriones descongelados con una malla de 20 µm con ASW limpia y se concentran en una probeta con ASW para su uso.

Resultados del proceso de criopreservación

Hemos desarrollado un protocolo completo de criopreservación de embriones de erizo de mar con una alta supervivencia que permite obtener un porcentaje alto de larvas normales que aunque pasan por un periodo de latencia post descongelación, por lo cual su desarrollo se ve un poco ralentizado, que dan lugar a larvas *Echinopluteus* de vida normal que pueden asentarse y producir juveniles.

- Los embriones de erizo de mar criopreservados pasan por un proceso de latencia post descongelación en la que el crecimiento es menor del 20% en las primeras 48 horas, alcanzando el estado de larva pluteus de 4 brazos a las 96 horas. El tamaño de la larva en ese momento será normalmente del 50% comparado con larvas de erizo no congeladas de 96 horas.
- El tamaño larvario es del 20% el tamaño de controles frescos a las 48 horas y mayor del 50% a las 96 horas.
- El 70% de las larvas criopreservadas sobreviven a un cultivo larvario completo de 20 días de duración en comparación con controles.
- El asentamiento medio de las larvas para producir juveniles es del 25% en comparación con los controles.

Uso de blástulas de erizo criopreservadas como bioensayo.

Este bioensayo comprende las siguientes etapas:

- 1.- Una vez descongelados las blástulas de erizo de mar y eliminados los crioprotectores presentes por dilución en 12 pasos equimolares (con cada paso de dilución la concentración de crioprotectores en la muestra se reduce en 0.125 M). (tabla 1).
- 2.- Los embriones se filtran y se transfieren a viales que contienen las soluciones experimentales, en este ejemplo son de plomo, en una densidad de 80 embriones mL⁻¹ y son incubados durante 96 horas hasta estado de larva pluteus de 4 brazos.
- 3.- Los viales se fijan con dos gotas de formol al 40% y se mide la longitud máxima de 35 larvas por vial como respuesta del bioensayo. En la figura 3, se muestran los resultados del bioensayo con embriones criopreservados (línea negra) en comparación con el bioensayo embrio-larvario estándar (línea gris) para erizo de mar (Saco-Álvarez *et al.* 2010).

Resultados del bioensayo

Los resultados indican que con el bioensayo de embriones criopreservados mediante el protocolo descrito previamente, se obtienen unas CE_{50} menores que con el bioensayo estándar ($81 \mu\text{g L}^{-1}$, $425 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), este bioensayo más sensible puede
5 ser de mucha utilidad para la detección de concentraciones más bajas de contaminantes en el medio ambiente (cuanto más bajas depende del compuesto). Una vez conocida la comparación entre ambos bioensayos se podrán utilizar embriones criopreservados para la evaluación de la contaminación marina a lo largo de todo el año con independencia de la temporada de reproducción de la especie, lo cual había representado hasta ahora
10 un hándicap para esta herramienta.

Este bioensayo con blástulas criopreservadas se ha probado utilizando, metales pesados, compuestos orgánicos y con elutriados de sedimentos portuarios. Aunque el ejemplo es con el plomo, este bioensayo es potencialmente utilizable con una amplísima gama de compuestos químicos al igual que el bioensayo embrio-larvario estándar de erizo de
15 mar.

REIVINDICACIONES

1. Protocolo de criopreservación para embriones de erizo de mar **que comprende** las siguientes etapas:
 - a. Obtención de embriones y proceso de fertilización e incubación para la obtención de blástulas.
 - b. Adición de un agente crioprotector a través de 15 pasos equimolares, de manera que cada adición incrementa en 0,1 la concentración en los viales, en una solución crioprotectora diluida en agua de mar
 - c. Criopreservación utilizando rampas de congelación incluyendo una etapa de “seeding”.
 - d. Descongelación y eliminación de la solución crioprotectora en 12 pasos equimolares en agua de mar.
2. Protocolo de criopreservación para embriones de erizo de mar según reivindicación 1, caracterizado por:
 - a. Obtención de blástulas según la etapa a) se realiza por incubación de ovocitos fertilizados durante 8 horas, en oscuridad, a 20°C.
 - b. La solución crioprotectora utilizada en la etapa b) está compuesta por dimethylsulfoxido 1.5M y trealosa 0.04M (final) en agua de mar, preparada a doble concentración de la final deseada.
 - c. La adición equimolar de la solución crioprotectora según la etapa b) se realiza utilizando una solución a doble concentración en pasos equimolares de 1 minuto, de manera que cada adición incrementa en 0,1 la concentración en los viales (dilución final 1:1) a la temperatura 19 ± 1 °C.
 - d. Aplicar rampa de congelación incluido “seeding según la etapa c)” primera rampa se inicia con pausa a 4 °C durante 2 min, enfriamiento a una tasa de 1 °C min^{-1} hasta la temperatura de “seeding” de -12 °C con pausa de 2 minutos. A continuación se alcanza la temperatura final de criopreservación de -80°C enfriando a 1 °C min^{-1} . Tras pausa final de 2 minutos los viales se retiran de la criocámara y se introducen en nitrógeno líquido.
 - e. Descongelación de los viales según la etapa d) por inmersión en baño de agua a 17 ± 1 °C (1.5-2 minutos).

- f. Retirada de los crioprotectores según etapa d) por dilución total con agua de mar en pasos equimolares de 1 minuto.
3. Procedimiento según reivindicaciones 1 y 2 para la criopreservación de embriones de erizo de mar, preferentemente *Paracentrotus lividus*.
- 5 4. Procedimiento según reivindicaciones 1 y 2 aplicable para criopreservación de embriones de otras especies de erizo de mar como *Strongylocentrotus spp.*, *Tetrapigus spp.*, *Evechinus spp.* *Hemicentrotus spp.*.
5. Bioensayo ecotoxicológico para evaluación de la contaminación marina con blástulas criopreservadas de erizo de mar siguiendo las reivindicaciones 1 y
10 2, que comprende las siguientes etapas:
 - a. Descongelación de embriones criopreservados y eliminación del agente crioprotector en agua de mar en 12 pasos equimolares.
 - b. Incubación de embriones hasta estado de larva pluteus de 4 brazos en viales que contienen las soluciones experimentales de contaminantes
15 en una densidad de 80 embriones mL⁻¹.
 - c. Medir la respuesta a las dosis de contaminante mediante cálculo de la concentración efectiva 50 (CE₅₀) que induce una respuesta del 50% en los organismos expuestos.
6. Bioensayo ecotoxicológico para evaluación de la contaminación marina con blástulas criopreservadas de erizo que comprende las siguientes etapas
20 descrito según reivindicación 5, caracterizado por las siguientes etapas:
 - a. Descongelación según la etapa a) de los viales por inmersión en baño de agua a 17 ± 1 °C durante un intervalo 1.5-2 minutos
 - b. Retirada del agente crioprotector según etapa a) por dilución con
25 agua de mar (concentración) en pasos equimolares de 1 minuto.
 - c. Incubación de embriones según etapa c) durante 96 horas a 20 °C en oscuridad.
 - d. Bioensayo según etapa c) fijando los viales con dos gotas de formol al 40% y medir respuesta a la longitud máxima de 35 larvas por vial.
- 30 7. Uso de bioensayo según reivindicaciones 5-6, para la evaluación de toxicidad de compuestos inorgánicos, orgánicos y elutriados en matrices de agua de mar.
8. Uso de un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2 para la aplicación de embriones criopreservados en acuicultura.

Figura 1

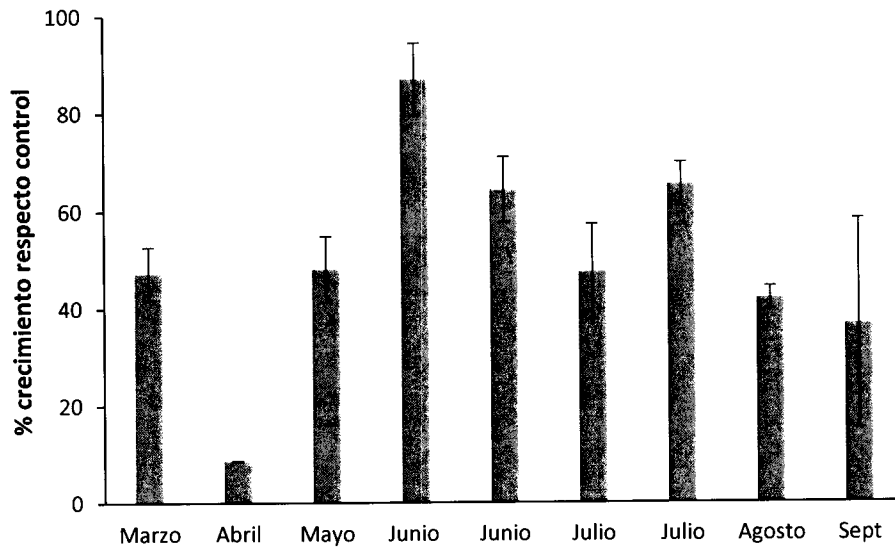


Figura 2

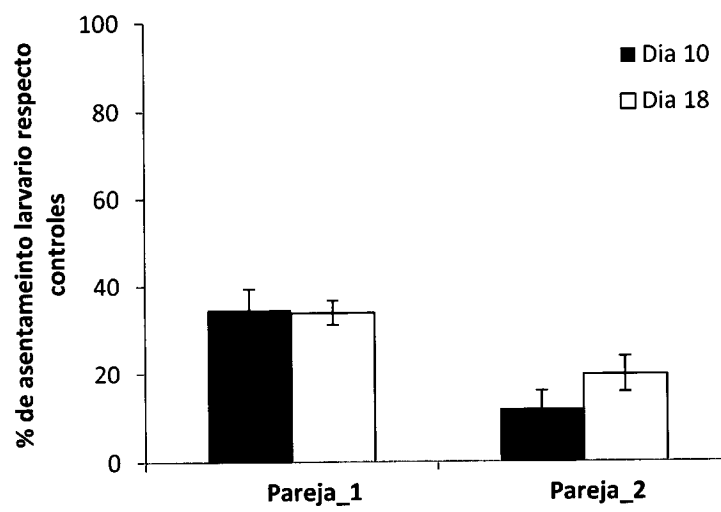
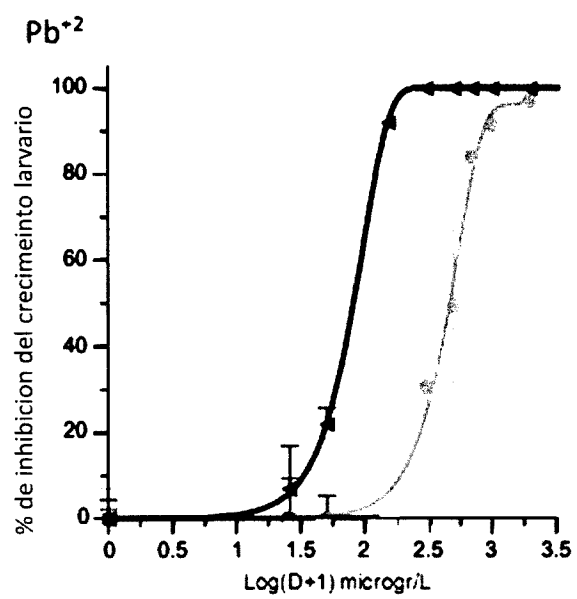


Figura 3





- ②① N.º solicitud: 201400536
②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.07.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BELLAS, J y PAREDES, E. Advances in the cryopreservation of sea-urchin embryos: Potential application in marine quality assessment. Cryobiology, 2011, vol. 62, páginas 174-180.	1-8
A	ODINTSOVA, N. et al. Cryopreservation of primary cell cultures of marine invertebrates. Cryoletters 2001, vol. 22, líneas 299-310.	1,2,4
A	ADAMS S. et al. The potential for cryopreserving larvae of the sea urchin, <i>Evechinus chloroticus</i> . Cryobiology, 2006, vol. 52, páginas 139-145.	1,2,4
A	GARMENDIA J.M. et al. Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas de erizo de mar <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816). Revista de Investigación Marina, 2009, vol. 11, página 1-25.	5-7
A	RU 2057337 C1 (GRITSENKO A M) 27.03.1996, Resumen de la base de datos EPODOC. Recuperado de EPOQUE [en línea] [recuperado el 04.05.2015]	5-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.05.2015

Examinador
A. I. Polo Díez

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/07 (2010.01)**A01N1/02** (2006.01)**G01N33/18** (2006.01)

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

C12N, A01N, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.05.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2, 4-6, 8	SI
	Reivindicaciones 1, 3, 7	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-8	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BELLAS, J y PAREDES, E.	2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, según la primera reivindicación, es un procedimiento de criopreservación para embriones de erizo de mar que comprende las etapas de:

- Fertilización e incubación hasta la obtención de blástulas
- Adición de agentes crioprotectores en 15 pasos equimolares, con una solución crioprotectora en agua de mar
- Criopreservación utilizando rampas de congelación e incluyendo una etapa de seeding
- Descongelación y eliminación de la solución crioprotectora en 12 pasos equimolares.

Las reivindicaciones 2 a 4 aportan detalles del procedimiento como los agentes crioprotectores utilizados, los tiempos de cada una de las etapas, etc.

También es objeto de la invención el uso del procedimiento anterior para la aplicación a embriones criopreservados en acuicultura (reivindicación 8), un bioensayo ecotoxicológico en el que se utilizan las blástulas criopreservadas por el método anterior (reivindicaciones 5 y 6) y el uso del bioensayo para la evaluación de la toxicidad de compuestos (reivindicación 7).

Novedad y actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 de L.P.)

El documento D01 es un estudio para determinar las mejores condiciones de criopreservación para embriones de erizos de mar de la especie *Paracentrotus lividus*. El procedimiento más adecuado incluye:

- Obtención de los gametos, fertilización e incubación durante 7 horas para obtener las blástulas
- Introducción de las blástulas en viales de 2 ml con 1 ml de agua marina y adición de dimetilsulfóxido (1,5 M) y trehalosa (0,04 M) como agentes crioprotectores. Los crioprotectores se añaden en 15 pasos equimolares.
- Mantenimiento a 4°C durante 2 minutos y congelación a una razón de -1°C/min hasta -12°C.
- Inclusión de una etapa de seeding (2 minutos)
- Congelación hasta -80°C a una velocidad de entre -1°C/min.
- Introducción de las blástulas en nitrógeno líquido.

La descongelación de las blástulas se realiza en baño de agua a 16°C y eliminando la solución crioprotectora en 12 pasos equimolares con agua de mar.

Las blástulas así tratadas se utilizan en bioensayos de contaminación, en los que se mide la longitud alcanzadas por las larvas pluteus de 4 brazos obtenidas a partir de las blástulas en 96 horas. Para ello se fijan las larvas con un 40% de formol y se mide la longitud de 35 de ellas.

El procedimiento descrito en D01 es igual al que se define en las reivindicaciones 1, 3 y 7, por lo que estas reivindicaciones no son nuevas respecto al documento.

Las reivindicaciones dependientes 2, 4-6, y 8 son nuevas pero no cumplen el requisito de actividad inventiva.

La reivindicación 2, que se refiere al procedimiento de criopreservación de las blástulas, incluye pequeñas diferencias en cuanto a tiempos y temperaturas respecto al procedimiento descrito en D01. Sin embargo, dichas diferencias no aportan ningún efecto técnico a la invención, tratándose de meros ajustes del procedimiento descrito en D01, que un experto en la materia llevaría a cabo sin ejercer actividad inventiva.

Las reivindicaciones 4 y 8, se refieren a posibilidades de llevar a cabo el procedimiento de criopreservación en otras especies de erizos y de utilizar los erizos criopreservados en acuicultura. En ausencia de ejemplos en la descripción relativos a estos procedimientos o usos, se considera que suponen una mera generalización dentro de las posibles aplicaciones y usos del procedimiento y carentes, por tanto, de actividad inventiva.

En cuanto a las reivindicaciones 5 y 6 relativas al bioensayo para evaluar contaminación marina utilizando las blástulas criopreservadas, se considera que tampoco tienen actividad inventiva respecto a D01.

El procedimiento para llevar a cabo el bioensayo ya estaba divulgado en esencia en D01 donde se aconsejaba extenderlo a 96 horas en lugar de 48 cuando se utilizan blástulas criopreservadas y utilizar la longitud de las 35 primera larvas como parámetro indicador de la respuesta al contaminante. Aunque en D01 no se mencionan algunos detalles como la densidad de embriones utilizada en el bioensayo y el cálculo de la concentración efectiva EC_{50} , se considera que dichos detalles serían evidentes para un experto en la materia, que conociendo las enseñanzas de D01 tuviese que poner a punto el bioensayo divulgado en ese documento.

Por tanto, en resumen, ninguna de las reivindicaciones 2, 4-6, y 8 cumplen el requisito de actividad inventiva a la vista de D01.