

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 506**

51 Int. Cl.:

A01K 67/02 (2006.01)
C12N 5/076 (2010.01)
A01N 37/44 (2006.01)
A01N 37/46 (2006.01)
A01N 45/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2010 PCT/JP2010/060320**
87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO2010147194**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2010 E 10789568 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2443920**

54 Título: **Disolución diluyente de esperma y método para inseminación artificial usando la misma**

30 Prioridad:

17.06.2009 JP 2009144703

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.06.2017

73 Titular/es:

**HIROSHIMA UNIVERSITY (100.0%)
3-2, Kagamiyama 1-chome Higashi-Hiroshima-shi
Hiroshima 739-8511, JP**

72 Inventor/es:

**SHIMADA MASAYUKI y
OKAZAKI TETSUJI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 620 506 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

Disolución diluyente de esperma y método para inseminación artificial usando la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un diluyente de esperma que va a usarse para dilución de esperma congelado para inseminación artificial de un mamífero no humano, especialmente un cerdo o similar, y a un método de inseminación artificial usando el diluyente de esperma.

Técnica anterior

10 La inseminación artificial es una tecnología importante en el campo de la cría de animales. La inseminación artificial de ganado se ha llevado a cabo hasta ahora principalmente con vacas. Sin embargo, todavía es necesario mejorar la tasa de concepción, y, en lo que se refiere a ganado distinto de vacas, todavía no se ha establecido la tecnología de inseminación artificial.

15 Por ejemplo, puesto que el cruzamiento natural se lleva a cabo principalmente en la industria porcina japonesa, deben mantenerse cerdos macho y por tanto se requiere un alto coste. Además, puesto que el peso corporal de un cerdo macho llega a ser no inferior a 300 kg, la operación conlleva riesgo. Además, puesto que se requiere mucho esfuerzo para el cruzamiento natural, se impide el desarrollo eficaz de buenas estirpes (por ejemplo, la mejora para obtener razas excelentes en cantidad de carne y tamaño de la camada) mediante cruzamiento.

20 En la actualidad, en algunos casos en la industria porcina japonesa, se lleva a cabo inseminación artificial. Sin embargo, puesto que en el sistema actual se envía semen líquido sólo una vez que lo solicitan las granjas de cerdos, el lapso de tiempo puede dar como resultado que se pierda el estro en los casos en que el estro se produce repentinamente.

25 Por tanto, se ha demandado el desarrollo de una tecnología que permita el almacenamiento de semen congelado en cada granja de cerdos y que posibilite de ese modo hacer frente a la aparición repentina del estro de un cerdo hembra. Sin embargo, en los casos de inseminación artificial usando semen congelado en cerdos, la movilidad del esperma es notablemente escasa tras la congelación-descongelación; la capacidad de fecundación del esperma es baja; la tasa de concepción varía dependiendo de factores tales como la estación y la raza; la tasa de concepción es baja; y el tamaño de la camada es pequeño (documento no de patente 1 y documento no de patente 2); de modo que la inseminación artificial usando semen congelado no se lleva a cabo casi en absoluto en el campo de la industria porcina. Además, el documento EP 1147774 da a conocer un método para la inseminación artificial de animales. El método comprende inseminar artificialmente al animal con esperma, combinado con un inhibidor de fosfodiesterasa o un equivalente funcional del mismo y opcionalmente una sal soluble de un metal alcalinotérreo y el uso de un inhibidor de fosfodiesterasa y una sal soluble de un metal alcalinotérreo en una composición que comprende además esperma para la reducción del reclutamiento de neutrófilos polimorfonucleares y un método para la inseminación artificial de animales.

Documentos de la técnica anterior

35 Bibliografía no de patente y bibliografía de patente

Documento no de patente 1: Tetsuji Okazaki y otros 2 autores, "Influences of Osmotic Pressure and Glycerol Concentration of Diluent on Motility and Implantation Rate of Pig Freeze-thawed Sperm", 107th Meeting of Japanese Society of Animal Science, General Lecture, V29-29.

40 Documento no de patente 2: Manual for Using Pig Frozen Semen (Tazaemon Niwa ed., 1989), Artificial Inseminator's Association of Japan.

Documento de patente: EP 1147774.

Divulgación de la invención

Problema que va a resolver la invención

45 Los presentes inventores propusieron un método de inseminación artificial usando esperma congelado preparado recogiendo esperma seguido por la retirada del plasma seminal y congelando (solicitud de patente japonesa n.º 2007-325313). Mediante la inseminación artificial de esperma congelado descongelado en un diluyente que contiene plasma seminal, se ha logrado la mejora de la tasa de concepción.

Sin embargo, existe el problema de que, puesto que el plasma seminal contiene patógenos tales como bacterias, el plasma seminal no puede usarse para producir "cerdos SPF (libres de patógenos específicos)", lo que ha atraído la atención en vista de la seguridad de los alimentos.

5 Además, puesto que los caracteres del plasma seminal que van a añadirse al diluyente varían entre individuos y dependiendo de la estación, es probable que la tasa de concepción y la tasa de implantación sean inestables.

Además, deben mantenerse cerdos macho para asegurar el plasma seminal.

10 La presente invención se realizó en vista de los hechos descritos anteriormente y se dirige a proporcionar un diluyente de esperma con el que, incluso sin inclusión de plasma seminal en el mismo, pueda obtenerse una tasa de concepción equivalente a o mayor que la tasa obtenida con un diluyente que contiene plasma seminal, y un método de inseminación artificial usando el diluyente de esperma.

Medios para resolver los problemas

El diluyente de esperma, que es el primer modo de la presente invención, comprende un agente de quelación que forma un complejo con un ion calcio, en el que dicho agente de quelación comprende EGTA y EDTA; y un factor inmunosupresor que suprime la migración de leucocitos, en el que dicho factor inmunosupresor comprende cortisol.

15 Se describe que el factor inmunosupresor puede comprender una o más seleccionadas de una hormona esteroidea y citocina.

Se describe que la hormona esteroidea comprende un derivado de cortisol.

Además se describe que, el derivado de cortisol comprende preferiblemente una o más seleccionadas de dexametasona, prednisona e hidrocortisona.

20 Además se describe que, la citocina puede comprender uno o más seleccionados de factor inhibidor de la migración de macrófagos y serpina E1.

Según una realización de la presente invención, el diluyente de esperma se usa preferiblemente para diluir esperma congelado preparado retirando el plasma seminal y congelando.

Además, el esperma congelado es preferiblemente esperma congelado de un mamífero no humano.

25 Además, el mamífero no humano es preferiblemente un animal múltiparo.

Además, el animal múltiparo es preferiblemente un cerdo.

En el método de inseminación artificial, que es el segundo modo de la presente invención,

esperma congelado preparado retirando plasma seminal del semen recogido de un mamífero no humano y congelando se diluye con el diluyente de esperma, para preparar semen artificial; y

30 el semen artificial se inyecta en el útero del mamífero no humano, para llevar a cabo inseminación artificial.

Además, preferiblemente se usa un animal múltiparo como mamífero no humano.

Además, preferiblemente se usa un cerdo como animal múltiparo.

Efecto de la invención

35 Puesto que el diluyente de esperma de la presente invención no contiene plasma seminal en absoluto, no hay problema de infección bacteriana, y por tanto puede usarse para la producción de cerdos SPF libres de patógenos específicos.

Además, puesto que no se usa plasma seminal, no hay influencia de las estaciones ni diferencias entre los individuos de los que se recoge el plasma seminal, de modo que puede realizarse inseminación artificial estable.

40 Además, puesto que el plasma seminal es innecesario, no hay necesidad de mantener muchos cerdos macho para asegurar el plasma seminal, lo que es ventajoso.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra resultados de detección de fosforilación de residuos de tirosina en las proteínas del esperma en el ejemplo experimental 1;

5 la figura 2 es un diagrama que muestra resultados de medición de la movilidad del esperma en el ejemplo experimental 2;

la figura 3 es un diagrama que muestra resultados de medición de la movilidad del esperma en el ejemplo experimental 2;

la figura 4 es un diagrama que muestra resultados de detección de fosforilación de residuos de tirosina en las proteínas del esperma en el ejemplo experimental 2;

10 la figura 5 es un diagrama que muestra resultados de medición de la tasa de daño acrosomal del esperma en el ejemplo experimental 2;

la figura 6 es un diagrama que muestra resultados de observación de iones calcio incorporados en esperma en el ejemplo experimental 2;

15 la figura 7 es un diagrama que muestra resultados de detección de fosforilación de residuos de tirosina en las proteínas del esperma en el ejemplo experimental 2;

la figura 8 es un diagrama que muestra resultados de medición de la movilidad del esperma en el ejemplo experimental 2;

la figura 9 es un diagrama que muestra resultados de detección de citocinas en plasma seminal en el ejemplo experimental 3; y

20 la figura 10 es un diagrama que muestra valores relativos del recuento de leucocitos en el útero en el ejemplo 2.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

(Diluyente de esperma)

25 Los presentes inventores descubrieron que, en esperma congelado, el esperma muere debido a la aparición de un daño funcional tras la descongelación, lo que conduce a disminución en la fecundidad en la inseminación artificial, y que este daño funcional no se observa en casos en que se usa un diluyente complementado con plasma seminal, lo que conduce a un alto rendimiento reproductor. Los presentes inventores descubrieron además que, en este daño funcional, el aumento del nivel de los iones calcio influye en la movilidad del esperma y en la fosforilación de residuos de tirosina de proteínas, completando de ese modo el diluyente de esperma del presente modo.

30 En el diluyente de esperma de la presente técnica, un agente de quelación, que forma un complejo con un ion calcio, está contenido en el diluyente de base mencionado posteriormente. La inclusión del agente de quelación en el diluyente de esperma suprime la fosforilación de las proteínas del esperma producida por la implicación de iones calcio tras la descongelación del esperma congelado, dando como resultado una disminución del daño funcional.

35 Más particularmente, en la parte media del esperma, hay una región rica en mitocondrias donde se genera la energía (ATP) que va a usarse para el movimiento del esperma. Cuando los iones calcio actúan sobre las mitocondrias (más particularmente, activa enzimas para producir ATP en las mitocondrias), se acelera la producción de ATP, lo que conduce al movimiento rápido del esperma, aunque una activación demasiado temprana del esperma produce la muerte del esperma antes de que esperma alcance el oviducto.

40 En un diluyente de esperma del presente modo, un agente de quelación está contenido en el diluyente, y el agente de quelación forma un complejo con un ion calcio, impidiendo de ese modo que los iones calcio actúen sobre las mitocondrias del esperma.

El diluyente de esperma del presente modo se obtiene añadiendo un agente de quelación que forma un complejo con un ion calcio a un diluyente de base.

45 En este caso, el diluyente de base significa un diluyente preparado de manera que el semen recogido puede almacenarse en el mismo a temperatura ambiente durante un periodo determinado sin deterioro de la función del esperma en el semen, diluyente que es un líquido que contiene componentes tales como glucosa, citrato de sodio,

bicarbonato de sodio, EDTA-2Na, ácido cítrico, Tris y/o cloruro de potasio. El diluyente de base no está limitado siempre que el diluyente de base sea un líquido usado habitualmente en este campo, y ejemplos del diluyente de base incluyen disolución de Modena (glucosa 0,15 M, citrato de sodio 26,7 mM, hidrogenocarbonato de sodio 11,9 mM, ácido cítrico 15,1 mM, EDTA-2Na 6,3 mM, Tris 46,6 mM y penicilina 1.000 UI/ml).

5 El agente de quelación no está limitado siempre que el agente de quelación sea una sustancia que forme un complejo específicamente con un ion calcio, y preferiblemente se usa ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA (ácido bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético de etilenglicol)). Puesto que el EGTA forma un complejo específicamente con un ion calcio, puede suprimirse eficazmente la acción de los iones calcio sobre las mitocondrias del esperma.

10 Además, junto con EGTA, se usa preferiblemente ácido etilendiaminatetraacético (EDTA). El EDTA es una sustancia que forma complejos con, además de con un ion calcio, diversos iones divalentes tales como un ion magnesio e ion zinc.

15 Al añadir tanto EDTA como EGTA, los iones calcio que no se han quelado con EDTA pueden quelarse con EGTA, y la mayoría de los iones calcio que existen en el diluyente de base pueden quelarse finalmente. Por ejemplo, en los casos en que sólo se usa EDTA como agente de quelación, es necesario que la concentración de EDTA en el diluyente de base sea alta con el fin de quelar todos los iones calcio con EDTA. Puesto que el diluyente de base contiene varios iones divalentes distintos de los iones calcio, tales como iones magnesio e iones zinc, también puede producirse quitación excesiva de estos iones divalentes donde la concentración de EDTA es demasiado alta, afectando a la función del esperma (fecundación). Por tanto, preferiblemente se añaden tanto EDTA como EGTA.

20 Basándose en los resultados experimentales mencionados posteriormente, en los casos en que se añaden tanto EDTA como EGTA, las concentraciones de EDTA y EGTA en el diluyente de esperma son de manera preferible aproximadamente de 3 a 9 mM y aproximadamente de 3 a 9 mM, respectivamente, de manera más preferible de 6,3 mM y 6 mM, respectivamente.

25 Además, con el fin de impedir que los leucocitos envuelvan (fragmenten o ataquen) al esperma, los embriones o similares en el útero, el diluyente de esperma contiene preferiblemente un factor inmunosupresor. Puesto que el esperma constituye una sustancia extraña para una hembra, la invasión del esperma en el útero produce migración de leucocitos tales como neutrófilos y macrófagos, produciendo la fagocitosis del esperma, los embriones o similares, lo que afecta a la tasa de implantación.

30 La tasa de implantación es la razón del número de fetos en el útero con respecto al número de óvulos. Puesto que, especialmente en un animal múltiparo tal como un cerdo, se liberan de 10 a 20 óvulos, es necesario en vista de la eficacia de producción fecundar la mayor cantidad de óvulos posible de una vez para permitir que nazcan un gran número de fetos.

Puesto que no es probable que se produzca la fagocitosis anterior en un cruzamiento natural, se cree que el plasma seminal en el semen contiene un factor inmunosupresor que suprime la migración de leucocitos y el aumento excesivo en los leucocitos, impidiendo de ese modo el ataque posterior a los embriones.

35 Por tanto, la inclusión de un factor inmunosupresor, que puede suprimir la migración de leucocitos, en el diluyente de esperma puede suprimir la fagocitosis del esperma o los embriones y obtener la mejora de la tasa de implantación.

Como factor inmunosupresor, se prefieren hormonas esteroideas y citocinas.

40 Una hormona esteroidea preferida es el cortisol, que es un componente contenido en el plasma seminal. Mediante la inclusión de cortisol en el diluyente, se inhibe la inmunidad de la función de celular y de ese modo se bloquea la migración de leucocitos y similares. De este modo, se suprime la fagocitosis del esperma o los embriones, y se obtiene la mejora de la tasa de implantación.

45 En los casos en que el diluyente se usa para inseminación artificial de cerdos, la cantidad de cortisol que va a añadirse en el diluyente de esperma usado para cada vez que hay inseminación artificial es de manera preferible aproximadamente de 100 ng a 10,000 ng. La cantidad de cortisol es más preferiblemente de 500 ng a 5,000 ng. Esta cantidad es casi igual que la cantidad de cortisol contenida en el plasma seminal total producido por un cerdo macho durante el cruzamiento natural.

50 Puesto que el cortisol está contenido originalmente en plasma seminal, y se descompone y se descarga al exterior del organismo en 1 ó 2 días tras la inyección en el útero, y puesto que el cortisol se inyecta localmente y no se extiende por todo el organismo, el organismo vivo no resulta afectado adversamente y no hay influencia perjudicial tal como producción de lechones con deformaciones.

Además, en lo que se refiere a otras hormonas esteroideas, también se considera que los derivados de cortisol tales como dexametasona, prednisolona e hidrocortisona cambian químicamente para dar cortisol y de ese modo muestran una acción inmunosupresora similar. Por tanto, también pueden usarse estas hormonas esteroideas.

5 Los ejemplos preferidos de las citocinas incluyen factores inhibidores de la migración de macrófagos (MIF) y serpina E1. Tanto los factores inhibidores de la migración de macrófagos como la serpina E1 son sustancias contenidas en el plasma seminal.

Las citocinas tales como los factores inhibidores de la migración de macrófagos y la serpina E1 son transductores de señales y suprimen la acumulación innecesaria de leucocitos tales como neutrófilos y macrófagos en el útero, y por tanto tienen una acción inmunosupresora.

10 (Método de inseminación artificial)

Ahora se describirán métodos de inseminación artificial que usan el diluyente de esperma mencionado anteriormente. Como ejemplo, a continuación se describirá un método de inseminación artificial de cerdos.

15 Se descongela esperma congelado preparado retirando plasma seminal del semen de un cerdo macho seguido por congelación, e inmediatamente tras la descongelación, se añade el esperma a un diluyente de esperma para preparar un semen artificial. Alternativamente, tras la descongelación del esperma congelado, el esperma congelado puede añadirse al diluyente de esperma.

20 Más particularmente, la descongelación del esperma congelado se lleva a cabo a 37°C durante 60 segundos en los casos en que se usa esperma congelado preparado llenando esperma en una pajuela de 5 ml seguido por congelación del esperma; o se lleva a cabo a 35°C durante 20 segundos, preferiblemente a 37°C durante 20 segundos, más preferiblemente a 70°C durante 8 segundos, lo más preferiblemente a 60°C durante 8 segundos en agua templada en los casos de una pajilla de 0,5 ml. Alternativamente, el diluyente de esperma puede añadirse directamente al esperma congelado.

25 El volumen del semen artificial usado para inseminación artificial de un cerdo es de aproximadamente 50 ml cada vez, y el semen artificial puede prepararse de manera que la concentración final del esperma sea del orden de 1×10^6 células/ml a 1×10^9 células/ml, preferiblemente del orden de 1×10^8 células/ml.

A continuación, mediante la inyección del semen artificial preparado en el útero de un cerdo hembra en estado de estro, puede llevarse a cabo la inseminación artificial.

30 Aproximadamente en el día 114 tras la inseminación artificial, se produce el parto del cerdo hembra. Tras el parto, los lechones pasan el periodo de lactancia durante de 20 a 40 días, seguido por el destete, y aproximadamente 4 días tras el destete, el cerdo hembra entra en estro de nuevo. La inseminación artificial puede llevarse a cabo de la misma manera que la descrita anteriormente en el momento de reaparición del estro en el cerdo hembra. Al llevarse a cabo la inseminación artificial en un ciclo de este tipo, puede nacer un mayor número de lechones durante el tiempo de vida de un cerdo hembra.

35 El diluyente de esperma puede almacenarse simplemente en un congelador. Por tanto, el diluyente de esperma puede usarse tras descongelarse cuando sea necesario, y puede usarse fácilmente en el momento del estro de un cerdo hembra o similar.

40 Puesto que el esperma congelado va a diluirse con el diluyente de esperma del presente modo, preferiblemente se usa esperma congelado preparado retirando plasma seminal del semen y congelando. De este modo, la inseminación artificial puede llevarse a cabo en condiciones completamente estériles, de modo que, por ejemplo, el esperma puede usarse también para la producción de cerdos SPF libres de patógenos específicos.

Además, dependiendo de la especie del mamífero, la inseminación artificial puede ser difícil puesto que el plasma seminal afecta adversamente a la congelación del esperma y por tanto no puede llevarse a cabo la congelación. Incluso en tales casos, retirando el plasma seminal y congelando el esperma, seguido por la dilución del esperma congelado con un diluyente de esperma del presente modo, puede llevarse a cabo la inseminación artificial.

45 Además, el diluyente de esperma del presente modo puede usarse para la inseminación artificial de cualquier mamífero no humano.

50 Además, el diluyente de esperma del presente modo puede usarse para mamíferos no humanos tales como animales domésticos, y puede usarse de manera adecuada para la inseminación artificial de animales múltiparos. Puesto que la tasa de implantación es alta también en animales múltiparos tales como cerdos, pueden nacer muchos fetos de una vez, de modo que pueda aumentarse la eficacia de producción.

Además, también en cerdos y similares, el diluyente de esperma del presente modo es útil para la mejora de las técnicas de cría tales como cría para mejorar la calidad de la carne y similares mediante el uso de esperma recogido sólo de cerdos macho que tienen buenos pedigríes.

Además, puesto que no se usa plasma seminal en absoluto, no hay necesidad de mantener muchos cerdos macho.

5 **(Ejemplo experimental 1)**

Mediante el cultivo de esperma de cerdo en un medio que contiene Ca^{2+} , se estudió la influencia de Ca^{2+} sobre la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del esperma.

Como medio que contiene Ca^{2+} , se usó mTBM (medio de tampón Tris modificado). La composición de mTBM se muestra en la tabla 1.

10

[TABLA 1]

11 mM	Glucosa
5 mM	Piruvato de sodio
113,1 mM	NaCl
3 mM	KCl
7,5 mM	CaCl ₂ ·2H ₂ O
20 mM	Tris
0,1% (p/v)	BSA (albúmina sérica bovina)

15

El esperma de cerdo que iba a usarse se recogió y se congeló tal como se describe a continuación. Los cerdos macho que iban a usarse para recoger el esperma se mantuvieron separados en pocilgas separadas, y se suministró un total de 2,5 kg de alimento para cerdos macho un total de dos veces por la mañana y por la tarde. Se inoculó a los cerdos con vacuna frente a infección por encefalitis japonesa/parvovirus porcino. Para este estudio, se seleccionaron cerdos negativos para anticuerpos frente al síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) y para la enfermedad de Aujeszky. La recogida de esperma se llevó a cabo a intervalos de 1 semana. Antes de la recogida de esperma, se comprobó el apetito, los síntomas de enfermedades y similares para confirmar que los cerdos estaban en buenas condiciones, y se recogió el esperma de manera que los cerdos no se inquietaran.

20

Se colocó un cerdo hembra ficticio en la pocilga de cada cerdo macho y el cerdo macho montó al cerdo hembra ficticio, seguido por lavado del pene y el interior del prepucio con suero salino fisiológico para retirar la orina. La recogida de esperma se llevó a cabo mediante la técnica manual con guantes, en la que se cubrió un recipiente estéril con gasa y entonces se colocó el semen en el interior del recipiente a la vez que se retiraba la sustancia gelatinosa, que es una sustancia similar a gelatina emitida junto con el semen. La recogida de semen se realizó para

25

de 50 a 100 ml solo de la fracción rica en esperma (aproximadamente existe en la fracción un 80% del esperma total en el semen), y se retiró inmediatamente el plasma seminal mediante centrifugación del semen tras la recogida de esperma.

30

A continuación, se diluyó el esperma usando un líquido de pretratamiento, y se ajustó la temperatura de la dilución resultante durante 2,5 horas a 15°C, seguido por retirada del sobrenadante mediante centrifugación y enfriamiento del producto resultante en una disolución con una presión osmótica de 400 mOsm/kg durante aproximadamente 1,5 horas hasta una temperatura de 4 a 5°C. La disolución era una disolución preparada ajustando la presión osmótica de NSF (expansor de congelación de Niwa y Sasaki; 80% (v/v), 0,31 mol de lactosa monohidratada, yema de huevo al 20% (v/v), penicilina G potásica 1000 U/ml, sulfato de estreptomycinina 1 mg/ml; presión osmótica, 300 mOsm/kg) a 400 mOsm/kg con agua ultrapura. Posteriormente, se añadió un agente crioprotector y OEP al

35

0,15% (tensoactivo Orvus Es Paste) a la dilución como un segundo diluyente. Además, se añadió una cantidad igual del diluyente secundario a la mezcla de esperma. La concentración de espermatozoides (concentración final) se ajustó en este caso a 1×10^9 células/ml. Tras la adición del agente crioprotector, se mantuvo la temperatura de la mezcla resultante a de 4 a 5°C durante aproximadamente 30 minutos, seguido por congelación de la mezcla. Para la congelación de la mezcla se usó nitrógeno líquido. Tras llenar una pajilla con la mezcla de esperma, se congeló el

esperma durante 10 minutos en vapor de nitrógeno líquido a una distancia de aproximadamente 4 cm desde la superficie del nitrógeno líquido, y se almacenó a continuación en nitrógeno líquido.

El esperma congelado de cerdo obtenido se descongeló a 60°C durante 8 segundos, y el esperma se añadió a un medio que contiene Ca²⁺ (mTBM), seguido por el cultivo del esperma. El cultivo se llevó a cabo durante 3 horas.

5 Además, como ejemplo de referencia 1, el esperma se añadió a un medio que contiene plasma seminal y se cultivo de la misma manera que la descrita anteriormente. La preparación del medio que contiene plasma seminal se llevó a cabo añadiendo plasma seminal al medio que contiene Ca²⁺ (mTBM) mencionado anteriormente hasta una concentración final del 10% (v/v). El plasma seminal se preparó retirando el esperma del semen recogido mediante centrifugación y sometiendo adicionalmente el producto resultante a centrifugación para retirar los sólidos del sobrenadante.
10

Además, como ejemplo de referencia 2, el esperma congelado-descongelado se añadió a un medio libre de Ca²⁺ y se cultivó de la misma manera que la descrita anteriormente. La preparación del medio libre de Ca²⁺ se llevó a cabo retirando el componente de Ca (CaCl₂·2H₂O) del medio que contiene Ca²⁺ (mTBM) mencionado anteriormente.

15 Tras el cultivo, se recogieron 20 µl de cada uno de los medios en que se cultivó el esperma y se almacenaron a -80°C para usarse para la detección de fosforilación de residuos de tirosina de proteínas. La detección de fosforilación de residuos de tirosina se llevó a cabo mediante inmunotransferencia de tipo Western.

La detección de fosforilación de residuos de tirosina mediante inmunotransferencia de tipo Western fue tal como sigue. Al esperma almacenado a -80°C, se añadieron 17 µl de un tampón de muestra de SDS, y se mezcló la mezcla resultante mediante pipeteo. Tras la centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos, se sometió la mezcla a ultrasonificación durante 2 minutos, seguido por calentamiento de la mezcla a 100°C durante 5 minutos y sometiendo el producto resultante a electroforesis a 100 V durante aproximadamente 2 horas. Se transfirieron las proteínas sobre una membrana y se bloqueó la membrana con TBS complementado con BSA al 5%, seguido por adición de un anticuerpo anti-tirosina fosforilada (anticuerpo primario, IgG de ratón) que se diluyó 2.000 veces con TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 0,15 M) complementado con BSA al 0,5% y Tween 20 al 0,1%, y haciendo reaccionar el anticuerpo con la membrana durante 12 horas a 4°C. Tras lavar la membrana durante 2 horas con TBS complementado con Tween 20 al 0,1%, se hizo reaccionar un anticuerpo anti-IgG de ratón (anticuerpo secundario) que se había diluido 2.000 veces con TBS complementado con BSA al 0,5% y Tween 20 al 0,1% con la membrana durante 1 hora. Entonces se lavó la membrana con TBS complementado con Tween 20 al 0,1% durante 1 hora. Se añadió un sustrato colorante a la membrana, y se dejó que la reacción continuara durante 5 minutos, seguido por exposición de la membrana a una película.
20
25
30

Los resultados de detección de fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del esperma en el esperma cultivado en los medios respectivos se muestran en la figura 1.

35 En el esperma cultivado en el medio que contiene Ca²⁺, se detectó una banda que indicaba una fuerte fosforilación de proteínas cerca de la banda indicada por la flecha en la figura 1. Se cree que en un medio que contiene Ca²⁺, el esperma no puede mantener su membrana celular normal debido a la fosforilación.

Por otra parte, en el esperma cultivado en el medio que contiene plasma seminal en el ejemplo de referencia 1, no se detectó ninguna banda similar que indicara fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del esperma, y por tanto se cree que la adición del plasma seminal evitaba la aparición de fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del esperma. Además, en el esperma cultivado en el medio libre de Ca²⁺ en el ejemplo de referencia 2, se detectó una banda que indicaba fosforilación de proteínas en cierto grado. Se consideró que esto se había producido, incluso tras la retirada del componente de Ca (CaCl₂·2H₂O), por la influencia de una pequeña cantidad de Ca²⁺ que existe en el agua pura que usó para mTBM.
40

45 A partir de los resultados anteriores, se reveló que la existencia de iones calcio está implicada en una pérdida funcional de esperma, y la supresión de la acción de Ca²⁺ sobre el esperma en un esperma congelado diluido es indispensable para la mejora de la tasa de concepción tras la inseminación artificial.

(Ejemplo experimental 2)

Se llevaron a cabo pruebas para confirmar si cultivar esperma de cerdo en un medio al que se añadió un agente de quelación suprime o no la disminución en la movilidad del esperma, la tasa de daño acrosomal del esperma y la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del esperma.

50 En primer lugar, se estudió la influencia de la adición de EDTA.

5 Se prepararon medios que tenían concentraciones de EDTA de 0 mM, 3 mM, 6,3 mM y 12 mM. El medio de EDTA 0 mM y el medio de EDTA 3 mM se prepararon retirando EDTA-2Na de la disolución de Modena y ajustando la concentración de EDTA a 0 mM y 3 mM, respectivamente. Como medio de EDTA 6,3 mM, se usó disolución de Modena tal cual. Además, el medio de EDTA 12 mM se preparó añadiendo EDTA-2Na a disolución de Modena para lograr una concentración de EDTA de 12 mM.

A cada medio, se le añadió espermatozoides congelados tras la descongelación como en el ejemplo experimental 1, y se cultivó el espermatozoides. El tiempo de cultivo fue de 1 hora, 3 horas o 6 horas.

10 Tras el cultivo, se calculó la movilidad del espermatozoides usando un analizador de movilidad (sistema de análisis de movilidad de espermatozoides asistido por ordenador (CASA)). Sobre una placa precalentada hasta 38°C, se colocaron 5 µl del medio tras el cultivo y se analizó la razón de espermatozoides en movimiento usando un ordenador.

La figura 2 muestra la movilidad del espermatozoides cultivado en cada condición.

Como resultado, con cualquier tiempo de cultivo, el espermatozoides cultivado en el medio de EDTA 6,3 mM mostró la movilidad del espermatozoides más alta.

15 Posteriormente se estudió la influencia de la adición de EGTA. En este estudio, se cultivó espermatozoides en un medio preparado mediante la adición adicional de EGTA al medio de EDTA 6,3 mM (disolución de Modena), que mostró la movilidad del espermatozoides más alta tal como se describió anteriormente. Tras el cultivo, se llevaron a cabo la medición de la movilidad del espermatozoides, la detección de fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del espermatozoides y la medición de la tasa de daño acrosomal del espermatozoides.

20 Se prepararon medio de EGTA 0 mM, medio de EGTA 3 mM, medio de EGTA 6 mM y medio de EGTA 9 mM. Como medio de EGTA 0 mM, se usó disolución de Modena tal cual. Además, el medio de EGTA 3 mM, el medio de EGTA 6 mM y el medio de EGTA 9 mM se prepararon añadiendo EGTA a disolución de Modena para lograr concentraciones de EGTA de 3 mM, 6 mM y 9 mM, respectivamente, en el medio. Puesto que la adición de EGTA da como resultado un pH más ácido del medio, se añadió NaOH al medio para ajustar el pH de 7,0 a 7,1.

25 A cada medio, se añadió espermatozoides congelados tras la descongelación como en el ejemplo experimental 1, y se cultivó el espermatozoides. El tiempo de cultivo fue de 1 hora, 3 horas o 6 horas.

El espermatozoides cultivado en cada condición se sometió a medición de la movilidad del espermatozoides, detección de fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del espermatozoides y medición de la tasa de daño acrosomal del espermatozoides.

30 La medición de la movilidad del espermatozoides y la detección de fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del espermatozoides se llevaron a cabo de la misma manera que la descrita anteriormente. La medición de la tasa de daño acrosomal del espermatozoides se llevó a cabo tal como sigue. Sobre un portaobjetos se extendieron 5 µl del medio, seguido por secado con aire y 10 minutos de fijación con metanol al 99%. Tras secar el metanol, se realizó una marca con una pluma líquida. Se añadió FITC-lectina de cacahuete al espermatozoides extendido (aproximadamente 30 µl por muestra), seguido por 30 minutos de incubación a 37°C en una atmósfera húmeda. A continuación, se lavó el espermatozoides con PBS (5 minutos x 3 veces) y se incluyó en DAPI (VECTOR, VECTASHIELD con DAPI, H-1200) y entonces en Manicure, seguido por observación del espermatozoides.

El resultado de la medición de la movilidad del espermatozoides se muestra en la figura 3; el resultado de la detección de fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del espermatozoides tras 3 horas de cultivo se muestra en la figura 4; y el resultado de la medición de la tasa de daño acrosomal del espermatozoides se muestra en la figura 5.

40 En los casos en que el EGTA estaba contenido en el diluyente de espermatozoides, la movilidad del espermatozoides fue alta y la tasa de daño acrosomal del espermatozoides fue baja en comparación con los casos en los que EGTA no estaba contenido. Además, el espermatozoides cultivado en el medio de EGTA 6 mM tenía la movilidad del espermatozoides más alta y mostró la fosforilación más suprimida de residuos de tirosina. Además, puede observarse que la tasa de daño acrosomal del espermatozoides también fue bajo. A partir de estos resultados, puede observarse que puede obtenerse un efecto positivo en los casos en los que el diluyente de espermatozoides contiene EGTA además de EDTA, y que el efecto máximo se observa cuando EGTA está contenido a una concentración de aproximadamente 6 mM.

Además, se observaron iones calcio incorporados en las células de espermatozoides.

50 A cada uno de un medio que contiene EDTA y un medio que contiene EDTA/EGTA, se añadió espermatozoides congelados de cerdo tras la descongelación. Como medio que contiene EDTA se usó disolución de Modena. El medio que contiene EDTA/EGTA se preparó añadiendo EGTA a la disolución de Modena para ajustar la concentración de EGTA a 6 mM.

A cada medio se le añadieron FLUO3/AM 5 μ M y Pluronic F127 al 0,02%, y se cultivó el esperma a 37°C durante 30 minutos en una sala oscura, permitiendo así que FLUO3 se incorporara en las células de esperma.

5 A continuación, se retiró el sobrenadante mediante centrifugación y se añadió una nueva alícuota de cada medio al esperma. A continuación se retiraron 5 μ l de cada medio sobre un portaobjetos y se observó el esperma bajo un microscopio de fluorescencia. Los resultados se muestran en la figura 6.

10 FLUO3 es una sustancia que emite fluorescencia uniéndose a un ion calcio. Cuando los iones calcio que existen en el medio se incorporan en las células de esperma, FLUO3 se une a un ion calcio, dando como resultado la emisión de fluorescencia verde. Tal como puede observarse en la figura 6, para cada tiempo de cultivo, el esperma cultivado en el medio que contiene EDTA mostró una emisión más fuerte que el esperma cultivado en el medio que contiene EDTA/EGTA. El esperma cultivado en el medio que contiene EDTA mostró una emisión muy fuerte especialmente cuando el tiempo de cultivo fue largo, pero el esperma cultivado en el medio que contiene EDTA/EGTA sólo mostró una emisión débil de la parte media. Puede observarse que la incorporación de iones calcio en el medio en el esperma podría suprimirse con EGTA.

15 Posteriormente, se cultivó el esperma congelado-descongelado en un medio que contiene EDTA, un medio que contiene EDTA/EGTA y un medio que contiene plasma seminal, y se sometió el esperma cultivado en cada medio a detección de fosforilación de residuos de tirosina y medición de la movilidad del esperma.

20 Como medio que contiene EDTA se usó disolución de Modena (EDTA 6,3 mM) tal cual. El medio que contiene EDTA/EGTA se preparó añadiendo EGTA a la disolución de Modena para ajustar la concentración de EGTA a 6 mM. El medio que contiene plasma seminal se preparó añadiendo plasma seminal a disolución de Modena hasta una concentración final del 10% (v/v). El esperma congelado se descongeló y se añadió a cada medio, seguido por cultivo del esperma durante 1 hora.

El esperma cultivado en cada medio se sometió a detección de fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas del esperma. Los resultados se muestran en la figura 7.

25 En el esperma cultivado en el medio que contiene EDTA y el medio que contiene plasma seminal, se detectaron bandas débiles que indican fosforilación de proteínas en la posición indicada por la flecha, mientras que en el esperma cultivado en el medio que contiene EDTA/EGTA no se detectó ninguna banda que indicara fosforilación de proteínas en la misma posición, lo que sugiere que la fosforilación de proteínas se suprimió completamente.

Además, el esperma tras el cultivo en cada medio se sometió a medición de la movilidad del esperma. Los resultados se muestran en la figura 8.

30 En los resultados que muestran la movilidad del esperma en la figura 8, se observó una movilidad más alta para el esperma cultivado en el medio que contiene EDTA/EGTA en comparación con el esperma cultivado en el medio que contiene plasma seminal.

35 Por tanto, en el esperma cultivado en el medio que contiene EDTA/EGTA, puesto que no se produjo fosforilación de residuos de tirosina de proteínas, la membrana celular del esperma tras la descongelación era normal, y también se observó mejora de la movilidad del esperma. Por tanto, puede observarse que, mediante la inclusión de un agente de quelación que forma un complejo con un ion calcio tal como EDTA/EGTA en un diluyente de base, puede prepararse un diluyente de esperma libre de plasma seminal.

40 A partir de los resultados experimentales anteriores, se demostró que los iones calcio están implicados en la activación del esperma y en el daño del acrosoma debido a la fosforilación de residuos de tirosina de proteínas tras descongelar el esperma congelado, y que la adición de EDTA y/o EGTA, que quelan un ion calcio, a un diluyente posibilita la supresión del aumento en los iones calcio en las células de esperma y por tanto de la activación del esperma y el daño del acrosoma, supresión que da como resultado el mantenimiento de la movilidad del esperma.

(Ejemplo 1)

45 Usando semen artificial preparado añadiendo esperma congelado de cerdo a un diluyente de esperma que contiene EDTA y EGTA, se llevó a cabo la inseminación artificial de cerdos.

Se añadió EGTA a la disolución de Modena para preparar un diluyente de esperma. La concentración de EDTA fue de 6,3 mM y la concentración de EGTA fue de 6 mM. A continuación, como en el ejemplo experimental 2, se añadió NaOH al diluyente para ajustar el pH de 7,0 a 7,1.

Se descongeló el esperma congelado a 60°C durante 8 segundos y se añadió al diluyente de esperma inmediatamente a continuación, para preparar semen artificial (a continuación en el presente documento denominado semen artificial A1). La concentración de espermatozoides fue de 1×10^8 espermatozoides/ml.

5 Los cerdos hembra que iban a someterse a inseminación artificial se prepararon mediante la inyección de 1.000 UI/individual de gonadotropina sérica (PMSG) y luego la administración de 750 UU/individuo de gonadotropina coriónica humana (hCG) 72 horas tras la inyección de PMSG, induciendo de ese modo superovulación. La inseminación artificial se llevó a cabo 40 horas tras la administración de hCG, mediante la inyección de aproximadamente 50 ml (número total de espermatozoides, 5 mil millones) de semen artificial A1 preparada tal como se describió anteriormente al útero de un cerdo hembra.

10 El día 21 tras la inseminación artificial, se confirmaron los fetos en un monitor en un diagnóstico de gestación por ecografía. El motivo por el cual se llevó a cabo la confirmación en el día 21 fue que, puesto que el estro se produce en un cerdo a intervalos de 21 días, la existencia de óvulos sin fecundar u óvulos fecundados degenerados da como resultado la aparición de un signo de estro en la región genital tras el diagnóstico de gestación en el día 21 tras la fecundación.

15 Además, se confirmó si se había producido reaparición mediante el método sin reaparición al mismo tiempo en el día 21, diagnosticando de ese modo la gestación.

20 Además, como ejemplo de referencia, se llevó a cabo inseminación artificial de la misma manera que la descrita anteriormente usando un semen artificial (a continuación en el presente documento denominado semen artificial B1) preparado congelando esperma congelado de la misma manera que la descrita anteriormente en un diluyente que contiene plasma seminal preparado añadiendo plasma seminal a la disolución de Modena (plasma seminal al 10% (v/v)).

25 Posteriormente, se midieron la tasa de concepción y la tasa de implantación para cada semen artificial. Las tasas de concepción se muestran en la tabla 2, y las tasas de implantación se muestran en la tabla 3. La tasa de concepción se calculó contando el número de individuos en los que se llevó a cabo la inseminación artificial y el número de individuos en los que hubo gestación. Además, la tasa de implantación se calculó contando el número total de cuerpos lúteos y el número total de fetos en el útero en 6 individuos de cerdos hembra.

[TABLA 2]

	Número de individuos en los que se llevó a cabo la inseminación artificial	Número de individuos en los que hubo gestación	Tasa de concepción (%)
Semen artificial A1	10	9	90
Semen artificial B1	12	10	83

[TABLA 3]

30

	Número total de cuerpos lúteos	Número total de fetos en el útero	Tasa de implantación (%)
Semen artificial A1	130	66	51
Semen artificial B1	100	78	78

En el caso del semen artificial A1 que contiene EDTA/EGTA, la tasa de concepción fue del 90%, que era un valor alto equivalente a la tasa de concepción en el caso del semen artificial B1 que contiene el 10% de plasma seminal.

5 Sin embargo, la tasa de implantación fue del 51%, que fue menor que la tasa de implantación del 78% en el caso del semen artificial B1 que contiene el 10% de plasma seminal, y la mayoría de los fetos se habían fagocitado. Además, en el caso de inseminación artificial usando el semen artificial A1, el lavado del oviducto de 3 individuos de cerdos hembra dio como resultado un número total de cuerpos lúteos de 51 y un número de fetos en el útero de 42, lo que indica una fecundidad en el oviducto del 82%. Por tanto, sin fagocitosis de los fetos, la tasa de implantación puede haber sido similar a la tasa de implantación observada con el semen artificial B1. Se cree que, en el caso de la inseminación artificial usando el semen artificial A1, los fetos se fagocitaron debido a la falta de inmunidad intrauterina tras la fecundación.

(Ejemplo experimental 3)

10 A partir de los resultados en el ejemplo 1, se cree que se requiere la existencia de plasma seminal para lograr la función de fecundación intrínseca y para la mejora adicional de la tasa de implantación, y que el plasma seminal contiene factores inmunosupresores mediante los cuales puede suprimirse la fagocitosis del esperma. Por tanto, se han realizado intentos para identificar los factores inmunosupresores en el plasma seminal.

15 Se recogió plasma seminal de 17 individuos de cerdos macho, y se midieron las hormonas esteroideas en el plasma seminal usando el método de EIA. Además, usando una matriz de anticuerpos de membrana (Proteome Profiler™ Array, Human Cytokine Array Panel A, ARY005), se detectaron las citocinas en el plasma seminal.

El resultado de la medición de hormonas esteroideas en el plasma seminal se muestra en la tabla 4, y el resultado de la detección de citocinas en el plasma seminal se muestra en la figura 9.

[Tabla 4]

	Cortisol (ng/ml)
En plasma seminal	0,92

20 Tal como se muestra en la tabla 4, se detectó 0,92 ng/ml de cortisol en el plasma seminal. Además, tal como se indica por los círculos en la figura 9, se detectaron MIF y serpina E1. En la membrana mostrada en la figura 9, 3 ubicaciones (izquierda superior, izquierda inferior y derecha superior) siempre emiten luz, y un total de 36 tipos de anticuerpos anti-citocina específicos están dispuestos en otras ubicaciones, en cada una de las cuales uno de los anticuerpos se representa en 2 posiciones. En los casos en que existe una citocina reactiva específicamente con un anticuerpo anti-citocina representado, la ubicación en la que el anticuerpo estaba representado emite luz.

25 A partir de los resultados anteriores, se identificó que el plasma seminal contiene el factor inmunosupresor cortisol, MIF y serpina E1. Se cree que la inclusión de estos factores en un diluyente puede dar lugar a la mejora de la tasa de implantación.

30 **(Ejemplo 2)**

Se preparó un semen artificial añadiendo esperma congelado de cerdo a un diluyente de esperma que contiene cortisol, EDTA y EGTA y se usó para realizar la inseminación artificial de cerdos.

35 En primer lugar, se añadieron cortisol y EGTA a la disolución de Modena para preparar un diluyente de esperma. La concentración de cortisol fue de 100 ng/ml; la concentración de EDTA fue de 6,3 mM; y la concentración de EGTA fue de 6 mM. Como en el ejemplo 1, se añadió NaOH al diluyente para ajustar el pH de 7,0 a 7,1.

Se descongeló el esperma congelado a 60°C durante 8 segundos y se añadió al diluyente de esperma inmediatamente a continuación, para preparar semen artificial (a continuación en el presente documento denominado semen artificial A2). La concentración de espermatozoides fue de 1×10^8 espermatozoides/ml.

40 Usando el diluyente de esperma preparado se llevó a cabo la inseminación artificial. El método fue igual que el del ejemplo 1 excepto en que no se administró PMSG al cerdo hembra.

Además, de la misma manera que en el ejemplo 1, la inseminación artificial se llevó a cabo usando el semen artificial A1 preparado diluyendo el esperma congelado con un diluyente de esperma al cual se añadieron EDTA y EGTA.

5 La tasa de concepción y la tasa de implantación se muestran en la tabla 5. La tasa de concepción se calculó contando el número de individuos de cerdos hembra con el que se llevó a cabo la inseminación artificial y el número de individuos de cerdos hembra en los que hubo gestación. Además, la tasa de implantación se calculó contando el número total de fetos en el útero y el número total de cuerpos lúteos en 4 individuos de cerdos hembra, seguido por dividir los valores entre el número de individuos.

[TABLA 5]

	Tasa de concepción (%)	Número de fetos en el útero (/individuos)	Tasa de implantación (%)
Semen artificial A1	90	11,0	51
Semen artificial A2	92	12,5	83*

10 La tasa de concepción en el caso de la inseminación artificial usando el diluyente de esperma que contiene cortisol fue del 92%, que fue mayor que la tasa obtenida con el diluyente de esperma libre de cortisol, y además, la tasa de implantación fue del 83%, que fue mucho mayor que la tasa del 51% obtenida con el diluyente de esperma libre de cortisol.

15 Además, la medición del recuento de leucocitos en el útero tras la inseminación artificial reveló que, tal como se indica por los valores relativos del recuento de leucocitos en el útero en la figura 10, el recuento de leucocitos en el útero en el caso del semen artificial A2 fue mucho más pequeño que en el caso del semen artificial A1, y además, incluso más pequeño que en el caso del semen artificial B1 en el ejemplo 1, en el que se usó plasma seminal. Por tanto, puede observarse que la acción inmunosupresora del cortisol suprimió la fagocitosis de los embriones tras la fecundación, dando como resultado la tasa de implantación mejorada.

20 Aunque la hormona cortisuprarrenal (una hormona esteroidea tal como cortisol) se inyecta habitualmente a una dosis de 5 a 50 mg por individuo para terapia de ganado, sólo se inyectaron 5 µg en el útero en la inseminación artificial del presente ejemplo. Por tanto, puesto que esta dosis es aproximadamente de 1.000 a 10.000 veces más pequeña que la dosis en los casos del uso terapéutico, se cree que la carne del cerdo madre y de los fetos en el útero no resulta afectada. Realmente, en lo que se refiere a los cerdos madre en los que se llevó a cabo la inseminación artificial usando el diluyente de esperma, 4 individuos están en el segundo mes de gestación y 6 individuos están en el primer mes de gestación en la actualidad, sin experimentar ningún estado patológico de los cerdos madre ni aborto. Además, incluso tras el parto, no se encontraron lechones con deformaciones, y por tanto no hubo influencia perjudicial de la adición de cortisol.

25 Tal como se ha indicado por los resultados experimentales anteriores, se realizó la preparación de un diluyente de esperma libre de plasma seminal.

30 La presente solicitud se basa en la solicitud de la patente japonesa n.º 2009-144703, presentada el 17 de junio de 2009, como referencia.

Aplicabilidad industrial

35 Tal como se describió anteriormente, el diluyente de esperma contiene un agente de quelación que forma un complejo con un ion calcio. Además, el diluyente de esperma contiene un factor inmunosupresor que suprime la migración de leucocitos. Añadiendo esperma congelado a este diluyente de esperma seguido por la realización de inseminación artificial, el esperma puede alcanzar los óvulos sin secarse, y el esperma y los embriones no se fagocitan por los leucocitos, dando como resultado una alta tasa de concepción y una alta tasa de implantación. El diluyente de esperma puede emplearse de manera adecuada en industrias tales como la industria de ganado en la que se crían mamíferos no humanos, y especialmente se emplea eficazmente para la cría de animales múltiparos tales como cerdos mediante inseminación artificial.

40

REIVINDICACIONES

1. Diluyente de esperma que comprende un agente de quelación que forma un complejo con un ion calcio, en el que dicho agente de quelación comprende EGTA y EDTA; y un factor inmunosupresor que suprime la migración de leucocitos, en el que dicho factor inmunosupresor comprende cortisol.
- 5 2. Uso de un diluyente de esperma según la reivindicación 1 para diluir esperma congelado preparado retirando el plasma seminal y congelando.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicho esperma congelado es esperma congelado de un mamífero no humano.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que dicho mamífero no humano es un animal múltiparo.
- 10 5. Uso según la reivindicación 4, en el que dicho animal múltiparo es un cerdo.
6. Método para inseminación artificial en el que
esperma congelado preparado retirando plasma seminal del semen recogido de un mamífero no humano y congelando se diluye con el diluyente de esperma según la reivindicación 1, para preparar semen artificial; y
dicho semen artificial se inyecta en el útero de dicho mamífero no humano, para llevar a cabo inseminación artificial.
- 15 7. Método para inseminación artificial según la reivindicación 6, en el que se usa un animal múltiparo como dicho mamífero no humano.
8. Método para inseminación artificial según la reivindicación 7, en el que se usa un cerdo como dicho animal múltiparo.

FIG. 1

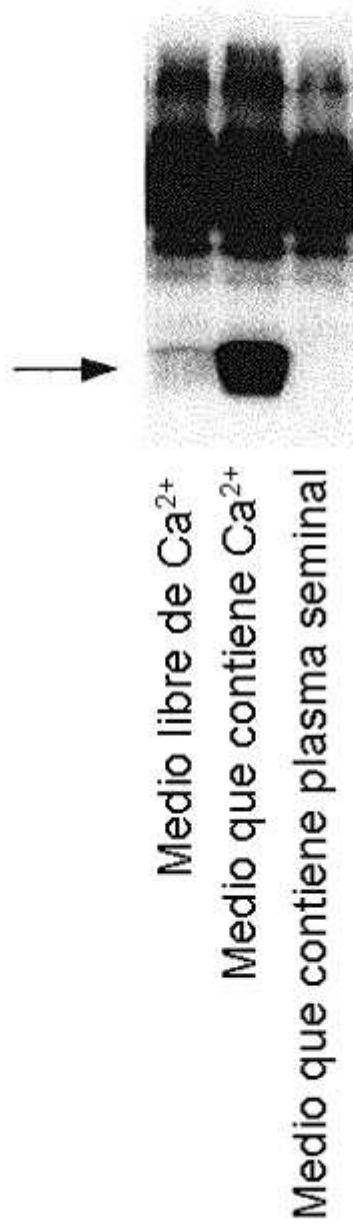


FIG.2

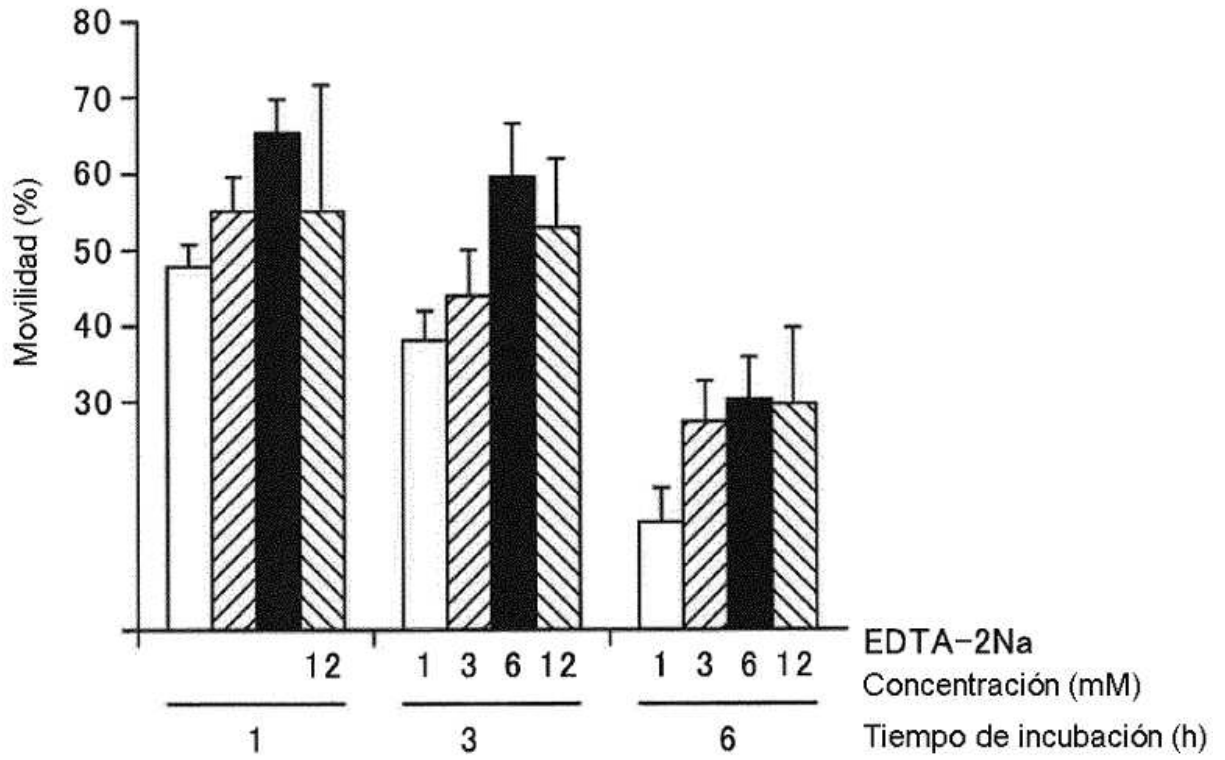


FIG.3

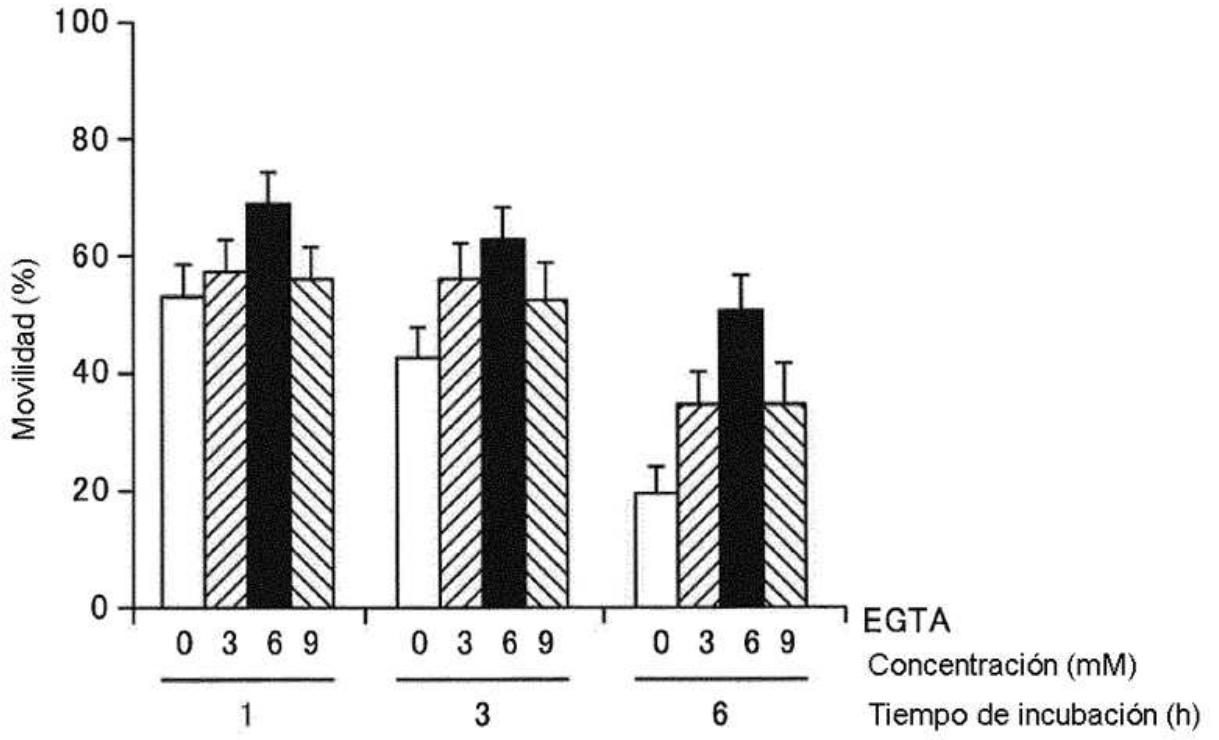


FIG.4

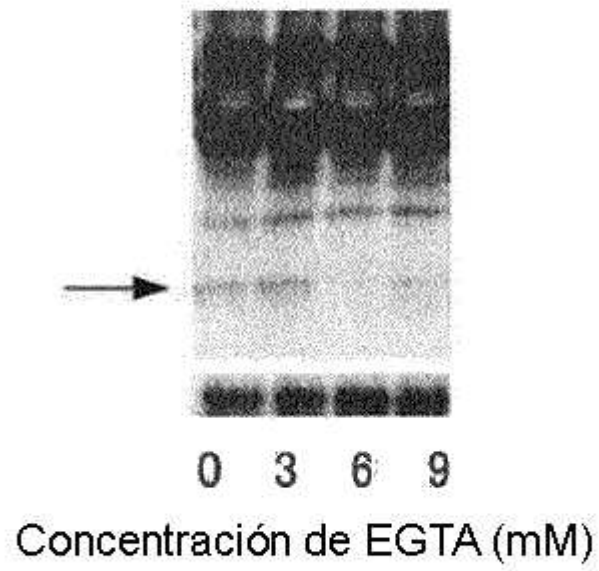


FIG.5

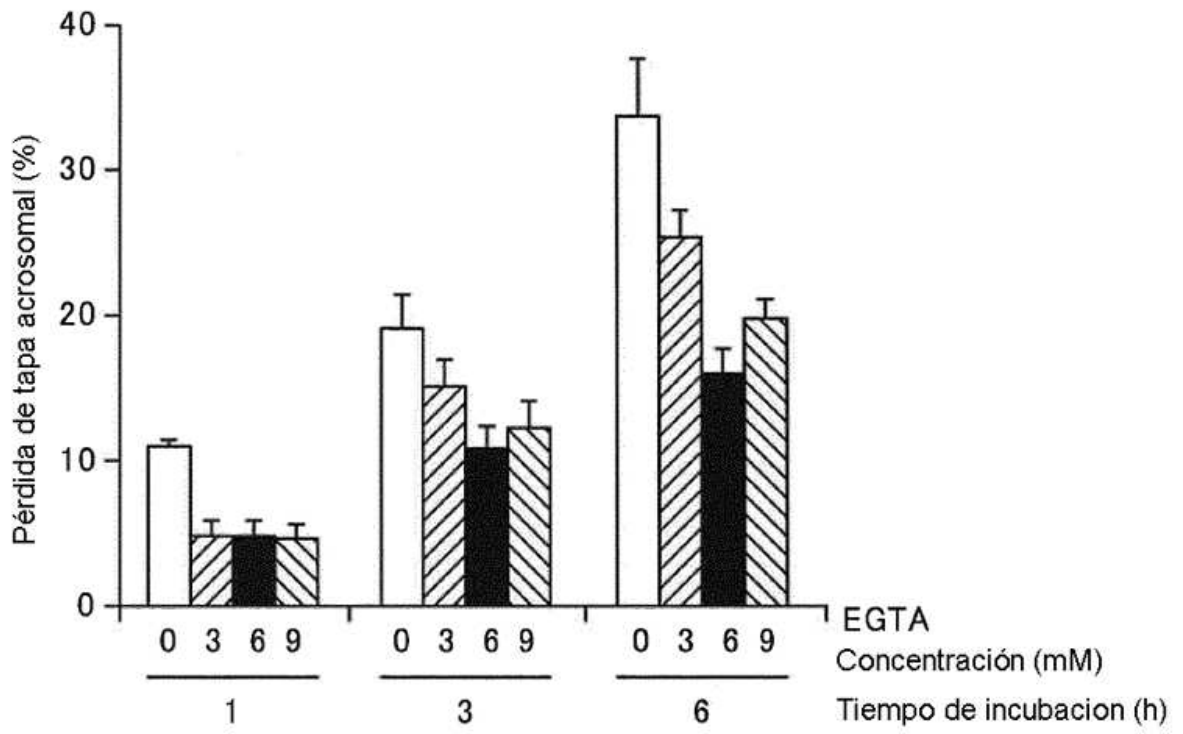


FIG.6

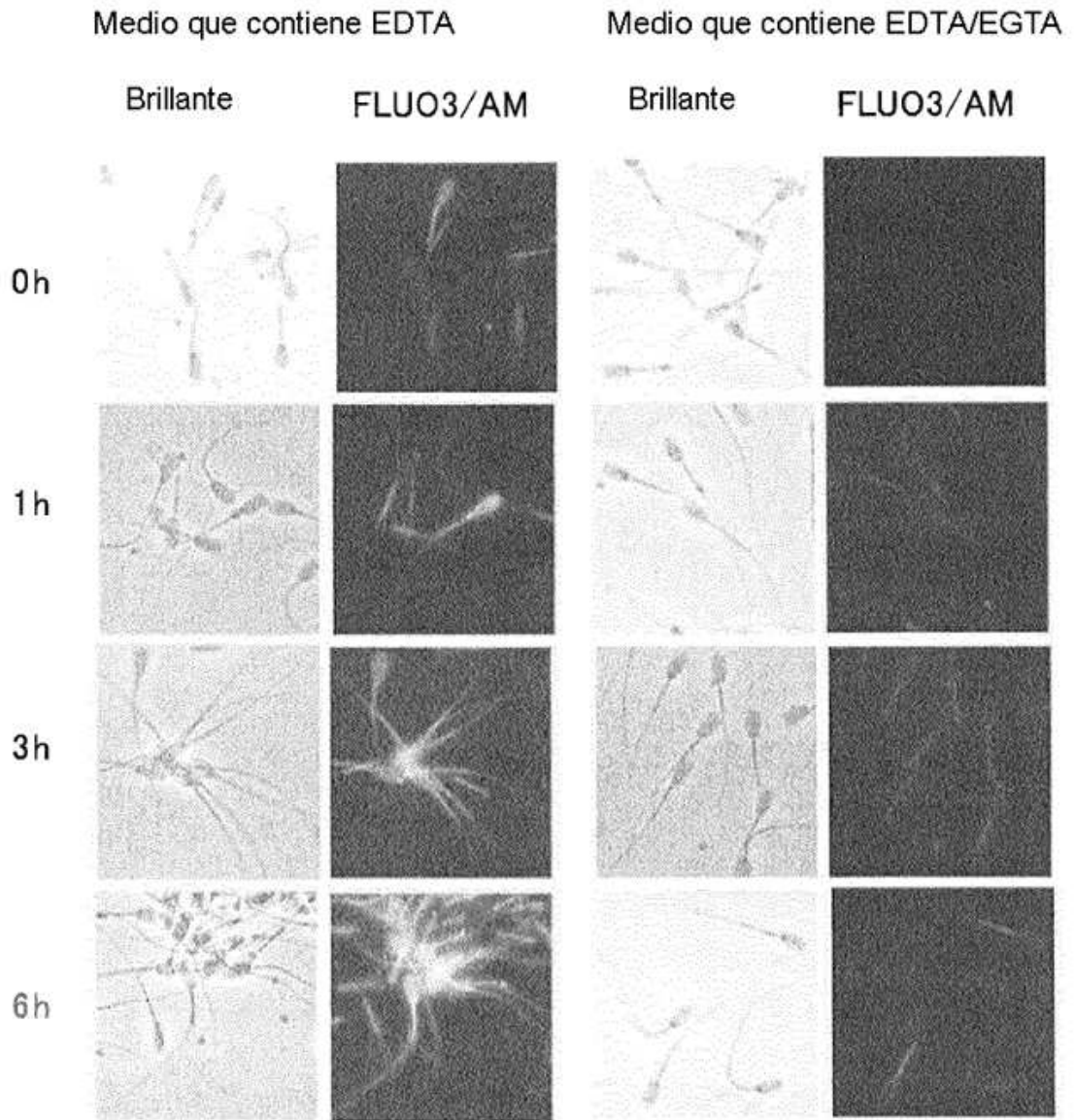
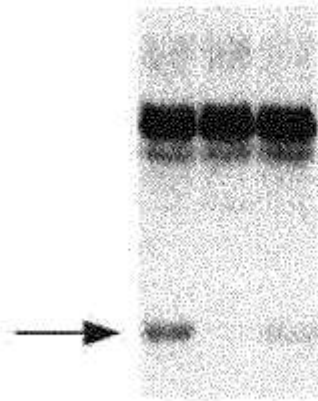


FIG.7



Medio que contiene EDTA
Medio que contiene EDTA/EGTA
Medio que contiene plasma seminal

FIG.8

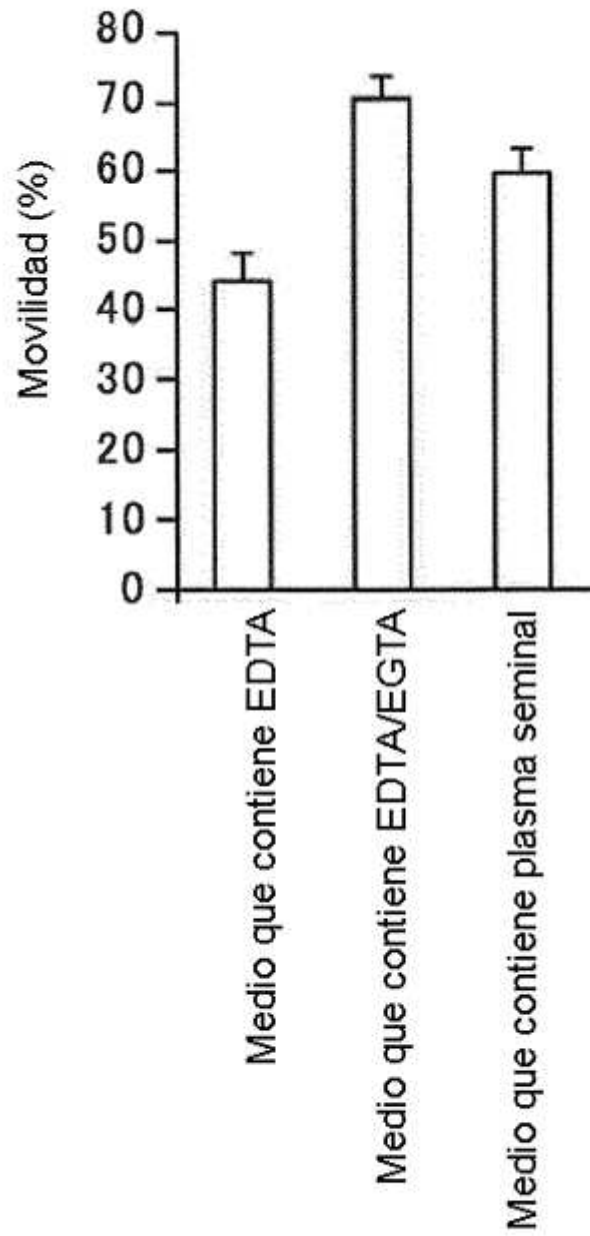


FIG.9

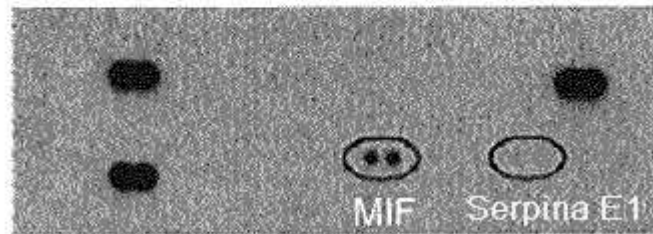


FIG.10

