

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 123**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2011 PCT/IB2011/050651**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO12028967**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2011 E 11713518 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2611290**

54 Título: **Método para la criopreservación de espermatozoides humanos libres de plasma seminal usando un proceso rápido y simple de vitrificación-desvitrificación aséptica**

30 Prioridad:

**30.08.2010 CL 9202010**

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

**19.09.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA (50.0%)  
1145 Avenida Francisco Salazar  
Temuco 4811230, CL y  
UNIVERSITÄT ULM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SANCHEZ GUTIERREZ, RAUL;  
RISOPATRON GONZALEZ, JENNIE;  
SCHULZ RUBILAR, MABEL;  
ISACHENKO, EVGENIA y  
ISACHENKO, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 633 123 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

Método para la criopreservación de espermatozoides humanos libres de plasma seminal usando un proceso rápido y simple de vitrificación-desvitrificación aséptica.

5 La invención desvela un método de criopreservación en etapas que implican la vitrificación y desvitrificación de espermatozoides humanos y su uso como una metodología aséptica, rápida y simple que se puede usar para la conservación de espermatozoides criopreservados que se implementa fácilmente en laboratorios sin requerimiento de un almacenamiento en N<sub>2</sub> líquido ya que pueden ser almacenados a -80°C. Estas condiciones son favorables para los laboratorios de reproducción asistida en general, dado que implica una alta reducción de los costes en la etapa de conservación, principalmente debido a los largos períodos en los que los espermatozoides deben estar  
10 criopreservados en bancos de esperma mantenidos en estos laboratorios.

Antecedentes de la invención

Las técnicas convencionales para criopreservación de células de mamífero se asocian generalmente con desventajas que disminuyen el posible uso de estas células en el ámbito clínico y de la investigación.

15 Concretamente, la congelación de espermatozoides es la técnica más ampliamente utilizada en reproducción asistida para preservar los gametos masculinos y proporcionar la oportunidad para fecundaciones futuras (Sanger y col., 1992). El principal deterioro comunicado causado por la criopreservación en los espermatozoides humanos, es una marcada reducción en la motilidad (Critser y col., 1988). La causa principal de daño celular producido durante la criopreservación se debe a la formación de cristales de hielo intracelulares (Muldrew y McGann, 1990). Este daño celular implica la rotura irreversible de las membranas plasmática y nuclear con una posterior alteración de los  
20 orgánulos celulares (Brotherton, 1990).

Los métodos tradicionales de congelación de espermatozoides utilizan crioprotectores intracelulares porque tienen la capacidad de permeabilizar la membrana plasmática y son capaces de penetrar en la célula. La eficacia asociada a la función espermática utilizando este tipo de crioprotectores es baja, con un máximo del 45 % de conservación de al menos una función celular relevante que es importante para este tipo de células como es su motilidad, ya que los crioprotectores permeables son criotóxicos y provocan daño en los orgánulos intracelulares y en la membrana plasmática, disminuyendo notablemente la capacidad de fecundación del espermatozoide. Además, esta técnica tiene un coste elevado debido al tipo de medios utilizados y a la prolongada conservación en N<sub>2</sub> líquido, y por tanto, su utilización se limita a la población de mayores ingresos o a programas con costes que no están cubiertos por el sistema sanitario, como en los países desarrollados.

30 La vitrificación es un método de criopreservación extremadamente rápido que requiere menos tiempo de ejecución, es más seguro y tiene un menor coste efectivo que la congelación tradicional. La vitrificación se ha investigado de manera amplia en embriones y oocitos (Chen y col., 2001; Isachenko y col., 2005), pero está menos desarrollada en espermatozoides, se pueden encontrar pocas publicaciones sobre este tema (Isachenko y col., 2004; Isachenko y col., 2008). En estas últimas publicaciones, los autores, que también son los inventores de la presente invención, desarrollaron las bases para un método de criopreservación en espermatozoides, libre de criopreservantes tóxicos.  
35 Sin embargo esta metodología no es aséptica, y no posee las características de simpleza y eficacia que, de hecho, sí se proporcionan mediante la composición óptima de los medios de la presente invención.

Este método es similar a formación de vidrio, que es una propiedad intrínseca de todos los líquidos que solo se necesita una velocidad de enfriamiento lo suficientemente rápida como para evitar el paso a través de la fase cristalina. Por ese motivo, la vitrificación no provoca un acercamiento de las moléculas de proteínas entre sí como en la congelación tradicional (Levitt, 1966), lo que evita la formación de puentes disulfuros que producen la desnaturalización de las proteínas (Fahy y col., 1984).

40 La vitrificación se lleva a cabo en volúmenes pequeños, de tal forma que la muestra se sumerge directamente en nitrógeno líquido, para aumentar la velocidad de enfriamiento y disminuir la formación de cristales de hielo (Nawroth y cols., 2002). Esto contribuye aún más a facilitar la metodología y los costes de la vitrificación de espermatozoides, ya que no requiere equipos criobiológicos especiales. Asimismo permite una conservación adecuada de la motilidad espermática, pero la ventaja más significativa en esta técnica es que no daña al ADN espermático.

45 La solicitud de patente US20080026361, presentada en 2007, desvela una composición que comprende un crioprotector, una membrana protectora que estabiliza o asiste en la estabilización de las membranas de los espermatozoides y un secuestrador de radicales, en donde el crioprotector es un azúcar, tal como sacarosa, la membrana protectora puede ser un agente proteico o un agente no proteico o una combinación de los mismos, siendo la albúmina un ejemplo de un posible agente proteico, y el secuestrador de radicales puede ser un agente reductor o un antioxidante. Esta publicación describe un kit que comprende una composición de vitrificación, un recipiente aislante, un envase criogénico, un receptáculo para los espermatozoides, tal como pajuelas, ampollas de  
50

vidrio, criotubos o crioviales. Sin embargo, la solicitud de patente US20080026361 utiliza una solución crioprotectora con una composición distinta a la de la presente invención; usando un medio que principalmente contiene glicerol (TYB) y opcionalmente suplementado con monotioglicerol.

La solicitud de patente US20090305224 (familia de WO2007120829) presentada en 2009, describe un método para la criopreservación de células de mamíferos tales como oocitos, hepatocitos, células madre, embriones o cigotos, útiles como herramienta clínica o para la investigación (por ejemplo tecnología reproductiva, trasplante de células, ingeniería de tejidos o medicina regenerativa). La publicación se centra en la determinación de los parámetros de rendimiento térmico de distintos materiales y soluciones, tales como la conductividad térmica de diversos materiales, principalmente cuarzo. Por otra parte, el documento US20090305224 no ejemplifica el uso del método propuesto para la vitrificación específica de espermatozoides humanos y no ejemplifica los materiales de las pajuelas de la presente invención, dado que el uso de cuarzo no solo aumenta los costes asociados, sino que también restringe la portabilidad y aplicabilidad de receptáculos conductores térmicos de este material en un kit comercial.

El artículo "Impact of three different cryoprotectant on the motility of post-thaw human sperm" (Hu y cols., 2007) se centra en la comparación de los niveles de efecto de un crioprotector de glucosa o crioprotectores con diferentes concentraciones de sacarosa en la motilidad de espermatozoides humanos tras la descongelación. En el estudio no se observaron grandes diferencias con otros crioprotectores cuando se usó glucosa como un crioprotector, en una concentración de 0,1 M. Sin embargo cuando se usó sacarosa en una concentración de 0,2 M, se observó una significativa disminución en los daños de los espermatozoides en comparación con otros crioprotectores. Sorprendentemente, el uso de una concentración de sacarosa en un intervalo mayor que 0,2 M constituye una concentración óptima para el medio de vitrificación para espermatozoides del método de la presente invención.

El documento EP 2156735 A1 enseña sobre un instrumento descrito como una pajuela de tres miembros para el almacenamiento de muestras biológicas vitrificadas, y el método relacionado. El método comprende dos crioprotectores diferentes llamados solución no vitrificante (VS1) y solución vitrificante (VS2). VS1 y VS2 es una nomenclatura usada típicamente en los kits comerciales de vitrificación de oocitos y embriones, VS1 se corresponde con una solución deshidratante y VS2 con una solución de vitrificación que contiene los crioprotectores.

El artículo "Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose" (Isachenko y cols., Reproduction, 2008, Vol. 136, n.º 2, p. 167-173, XP055265907) investiga la capacidad de la sacarosa como crioprotector de espermatozoides frente al daño mitocondrial, y su efecto en la reacción de criocapacitación y acrosomal, durante la vitrificación. Fue la primera técnica en lograr niveles adecuados de la función espermática en seres humanos, pero por vitrificación no aséptica.

El documento 2009/081782 enseña un método de vitrificación de oocitos humanos.

El documento US 2006/046243 A1 enseña sobre un método de criopreservación que pretende vitrificar células de mamífero. El procedimiento incluye la selección de espermatozoides usando distintos medios de cultivo, donde un medio particular comprende HTF (Fluido Tubal Humano) suplementado con sacarosa 0,25 M y HSA (albúmina de suero humano) al 1 %. Tras la vitrificación se evaluaron distintas propiedades funcionales de los espermatozoides, y el artículo concluye que el medio con sacarosa fue significativamente mejor para conservar la motilidad progresiva de los espermatozoides tras la desvitrificación. La metodología que se ha usado para vitrificar la suspensión celular consistió en esferas vitrificantes de 30 µl que se echaron directamente al nitrógeno líquido, siendo esta una metodología eficaz pero no aséptica, ya que las gotas entraban directamente en contacto con el nitrógeno líquido. Sorprendentemente, el uso del método de la presente invención, además de ser aséptico, permite la preservación de un volumen de hasta 100 µl, y por tanto, es un método más eficaz cuando están disponibles mayores volúmenes de muestra.

Las técnicas utilizadas para la congelación de espermatozoides requieren de un equipamiento específico y de nitrógeno líquido para la mantener las muestras durante algún tiempo, lo que implica un alto coste. Por lo tanto, el acceso a esta alternativa de conservación se limita a un pequeño grupo de pacientes que se pueden permitir el procedimiento. La técnica convencional de congelación tiene una baja tasa de recuperación de espermatozoides móviles y funcionales, dado a que se congela toda la muestra de líquido seminal (espermatozoides + plasma seminal) junto con todos los contaminantes biológicos (bacterias, hongos y virus) que pudieran estar presentes.

La presente invención resuelve el problema de la técnica optimizando el uso de materiales y tiempo implicados en la criopreservación mediante vitrificación, permitiendo obtener mejores resultados usando una suspensión de espermatozoides vitrificados en sacarosa 0,25 M, con un alto porcentaje de espermatozoides móviles, viables que tienen una integridad del acrosoma mayor del 80 % tras la desvitrificación. El uso de sacarosa en lugar de otros criopreservantes evita el daño osmótico y la cristalización. Más importante aún, los espermatozoides vitrificados en sacarosa conservaron una mejor función espermática, ya que más del 60 % presentaba un potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{MMit}$ ) sin alteración. El parámetro de medición  $\Delta\Psi\text{MMit}$  es la forma más sensible para evaluar la función de los espermatozoides (Marchetti y cols., 2002).

La técnica de criopreservación de la presente invención implica la vitrificación sólo de espermatozoides móviles seleccionados usando técnicas de selección espermática, de tal manera que se eliminan espermatozoides anormales o dañados y las células infiltradas, así como todo el plasma seminal.

5 Por otra parte, hace posible la criopreservación de la función espermática de manera altamente eficaz, usando un kit de vitrificación para espermatozoides humanos cuya formulación sin crioprotectores permeables que es capaz de proteger la integridad y la función reproductiva sin requerir equipamiento especial para el almacenamiento. También será posible implementar una técnica de vitrificación fácilmente aplicable para los espermatozoides usando un kit de vitrificación con un coste de al menos el 50 % menor que el coste de un kit de congelación tradicional para un mercado demandante en países desarrollados que actualmente usa el método convencional de congelación.  
10 Asimismo, este bajo coste permitirá su uso y distribución a países en vías de desarrollo.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención desvela un método para la criopreservación de espermatozoides libres de plasma seminal usando vitrificación y desvitrificación de espermatozoides humanos que comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar espermatozoides libres de líquido seminal,
- 15 (b) resuspender y mezclar los espermatozoides en una proporción volumétrica de 1:1 con un medio de vitrificación que comprende:
  - i) medio de tamponamiento para espermatozoides
  - ii) un crioprotector no permeable con una concentración final de 0,15 a 0,30 M y
  - iii) un suero suplementado con dextrano;
- 20 (c) mezclar y ajustar la concentración final de espermatozoides a un intervalo de  $0,2 \times 10^6$  a  $1,8 \times 10^6$  de espermatozoides por 100  $\mu$ l de dicho medio de vitrificación.
- (d) colocar 100  $\mu$ l de la suspensión de espermatozoides y medio de vitrificación inmediatamente después de la etapa (c) en una pajuela de 0,25 ml, dejando 1 cm libre de líquido en ambos extremos, colocando esta primera pajuela dentro de una segunda pajuela de 0,5 ml que se sella en ambos extremos, colocando la primera y  
25 segunda pajuelas de manera horizontal en un receptáculo termoconductor.
- (e) sumergir dicha pajuela sellada de 0,5 ml con el contenido espermático en posición horizontal en  $N_2$  líquido;
- (f) mantener la muestra de esperma dentro de las pajuelas a una temperatura entre  $-75^\circ C$  y  $-85^\circ C$ ;
- (g) desvitrificar la muestra introduciendo la pajuela de 0,25 ml que contiene la muestra vitrificada en un medio de desvitrificación que comprende:
  - 30 i) medio de tamponamiento para espermatozoides,
  - ii) fluido tubal humano suplementado con el 1 % en peso/volumen de albúmina de suero bovino y
  - iii) un suero suplementado con dextrano.

35 donde la desvitrificación se lleva a cabo, primero colocando las muestras que se desean desvitrificar en un recipiente con  $N_2$  líquido, y después, introduciendo tres (3) pajuelas de 0,25 ml con muestra en un tubo con 5 ml de medio de desvitrificación incubado a una temperatura que oscila de  $36,5$  a  $37,5^\circ C$  en un bloque de calefacción.

40 Como alternativa, se puede llevar a cabo una etapa adicional que comprende: centrifugar a la muestra a 1.800 rpm durante 5 minutos, para eliminar el medio de desvitrificación; posteriormente, resuspender la muestra libre de sobrenadante en medio para espermatozoides y evaluar la motilidad de los espermatozoides; y utilizar para la técnica de reproducción deseada.

El uso del método de la presente invención se destaca para el tratamiento de trastornos relacionados con fracasos reproductivos o en pacientes que se estén sometiendo a un tratamiento de reproducción asistida, y también en pacientes que requieren la conservación de su capacidad de fecundación en determinadas patologías tales como cáncer o infecciones víricas tales como VIH que amenacen su capacidad reproductiva.

45

## Ejemplos de aplicación

### Vitrificación aséptica de espermatozoides

5 Las muestras de líquido seminal se obtuvieron de pacientes en un período de abstinencia sexual de al menos 48 horas antes de la recogida de la muestra, con la previa firma del consentimiento informado. Todas las muestras contenían al menos 20.000.000 de espermatozoides por ml; el 50 % de los mismos teniendo una motilidad progresiva y una morfología normal  $\leq$  al 15 %. Las muestras de líquido seminal normozoospermico se seleccionaron usando la técnica de "swim up". Esta técnica permite la obtención de fracciones de espermatozoides con los niveles más altos de actividad y viabilidad.

10 Se resuspendieron los espermatozoides en Medio de Vitrisperm; preparado a partir de 0,495 ml de medio de tampón para gametos (COOK®); 0,495 ml de solución de sacarosa 0,5 M (MP Biomedicals, Cat. 152584); y 0,010 ml de un suero suplementado con dextrano (IrvineScientific, Cat. 9301).

15 Los espermatozoides seleccionados se mezclaron con el medio de vitrificación (en una proporción volumétrica de 1:1) sólo antes del proceso de vitrificación, dado que no es aconsejable someter a las células al medio de vitrificación durante mucho tiempo, y se ajustó la concentración final a  $0,5 \times 10^6 - 1,8 \times 10^6$  espermatozoides por 100  $\mu$ l de medio de vitrificación. Posteriormente, con ayuda de un dispositivo de pipeteo, se colocaron 100  $\mu$ l de la suspensión en cada pajuela de 0,25 ml dejando un espacio de 1 cm en cada extremo.

Posteriormente se introdujo horizontalmente la pajuela de 0,25 ml dentro de la pajuela de 0,5 ml y los extremos abiertos de la pajuela de 0,5 ml se sellaron. Es importante mantener siempre la posición horizontal de la pajuela desde la etapa de llenado hasta su sumersión en N<sub>2</sub> líquido.

### 20 Desvitrificación aséptica de espermatozoides

Se rellenó un recipiente con N<sub>2</sub> líquido y las pajuelas a desvitrificar se pusieron dentro. De manera simultánea, 5 ml de medio de desvitrificación que contiene 4,95 ml de tampón de gametos (COOK®) y 0,05 ml del suero suplementado con dextrano (IrvineScientific, Cat.9301) se equilibraron a 37 °C.

25 Se colocó cerca del recipiente un bloque de calefacción (baño de agua) a 37 °C con los tubos con 5 ml de medio de desvitrificación. Se utilizó 1 tubo con 5 ml de medio por cada 3 pajuelas.

30 Utilizando pinzas se sacaron una a una las pajuelas del N<sub>2</sub> líquido, la pajuela de 0,5 ml se cortó por el lugar con un extremo marcado, y la pajuela de 0,25 ml se dejó caer en el medio de desvitrificación, invirtiendo la pajuela de 0,5 ml previamente cortada, ayudando en el proceso con el movimiento de la pajuela con la ayuda de unas pinzas estériles. La pajuela de 0,25 ml se estabilizó en el medio durante al menos 5 minutos con incubación a 37 °C. El medio se centrifugó a 1.800 rpm durante 5 minutos para concentrar y eliminar el sobrenadante. El sedimento se lavó una vez con medio para espermatozoides (tampón de gametos) y luego se aplicó una técnica de selección, o inmediatamente se realizaron los ensayos para evaluar el estado de los espermatozoides tras la vitrificación.

### Evaluación de la calidad espermática

35 Se contrastaron diversos parámetros de calidad espermática, principalmente la motilidad espermática y la viabilidad, para las condiciones de: una muestra control sin criopreservar, la muestra sometida al proceso de vitrificación/desvitrificación tal como se enseña en los primeros ejemplos; y una muestra congelada/descongelada en N<sub>2</sub> líquido con un crioprotector comercial (método de congelación tradicional). Todos los ensayos descritos en la siguiente sección se realizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).

40 La motilidad se midió utilizando una cámara Makler. La movilidad se estimó usando microscopio de luz con 400X de aumento. Se midió este parámetro sólo para los espermatozoides que tienen motilidad progresiva de categorías a y b (a, progresión rápida y lineal; b, progresión lenta y lineal).

La integridad de la membrana acrosomal se determinó utilizando el kit comercial PSA-FITC Sigma L-2857. Mientras que la criocapacitación espermática se determinó midiendo la translocación de fosfatidil-serina, usando el kit comercial ANEXINA V-FITC APOPTEST™- FITC (Nexins Research).

45 Además el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ Mit), se midió utilizando un único colorante catiónico conocido como JC-1 (Smiley y cols, 1991). El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones de un kit comercial para la detección de la permeabilidad de membrana mitocondrial (Kit AK-116, Mit-E- $\Psi$ , BIOMOL International LP).

Los resultados obtenidos de estos cuatro ensayos se presentan en porcentajes en la siguiente tabla resumen.

Ensayo	Resultado %	Condición de la muestra		
		Control	Vitrificación	Congelación
Translocación de fosfatidil-serina	promedio	1,555	1,59	20,05
	desviación estándar	1,027	0,9317	1,06
Pérdida de la integridad de la membrana	promedio	3,43	28,03	41,43
	desviación estándar	3,459	6,919	1,688
Potencial de membrana mitocondrial	promedio	89,3	71,65	29,45
	desviación estándar	10,49	1,708	4,342
Motilidad	promedio	95,78	77,72	28,32
	desviación estándar	1,704	2,26	3,408

5 A partir de la tabla anterior, los resultados sorprendentes del método utilizado en la presente invención destacan con respecto a la técnica de congelación que se usa comúnmente en los laboratorios. En estos resultados, la translocación de fosfatidil-serina indica un comportamiento que es muy similar al de una muestra reciente que no se ha vitrificado. La pérdida de integridad de membrana acrosomal es menor a la obtenida con la metodología de congelación, en donde el valor de  $\Delta\Psi_{Mit}$  de la muestra vitrificada/desvitrificada es muy similar con el valor correspondiente de la muestra control. También se puede observar que la pérdida de motilidad de la muestra vitrificada es mucho menor que la de la muestra congelada.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para la criopreservación de espermatozoides humanos libres de plasma seminal usando un proceso rápido y simple de vitrificación-desvitrificación aséptica, comprendiendo dicho método:

- 5 (a) proporcionar espermatozoides libres de líquido seminal;  
(b) resuspender y mezclar los espermatozoides obtenidos en la etapa (a) en una proporción volumétrica de 1:1 con un medio de vitrificación que comprende:
- i) medio de tamponamiento para espermatozoides,
  - ii) un crioprotector no permeable con una concentración final de 0,15 a 0,30 M, y
  - iii) un suero suplementado con dextrano
- 10 (c) mezclar y ajustar la concentración final de los espermatozoides a un intervalo de  $0,2 \times 10^6$  a  $1,8 \times 10^6$  espermatozoides por 100  $\mu$ l de dicho medio de vitrificación;  
(d) colocar 100  $\mu$ l de la mezcla de espermatozoides y medio de vitrificación inmediatamente después de la etapa (c) en una pajuela de 0,25 ml, dejando 1 cm libre de líquido en ambos extremos, colocando esta primera pajuela dentro de una segunda pajuela de 0,5 ml para sellar en ambos extremos, colocando la primera y la segunda
- 15 pajuela de manera horizontal en un receptáculo termoconductor;  
(e) sumergir la pajuela de 0,5 ml resultante de la etapa d) con el contenido espermático en posición horizontal en N<sub>2</sub> líquido;  
(f) mantener la muestra de esperma dentro de las pajuelas a una temperatura entre -75 °C y -85 °C;  
(g) desvitrificar la muestra mediante introducción de la pajuela que contiene la muestra de esperma en un medio
- 20 de desvitrificación que comprende:
- i) medio de tamponamiento para espermatozoides,
  - ii) fluido tubal humano suplementado con albúmina de suero bovino al 1 % de p/v, y
  - iii) un suero suplementado con dextrano;

25 en donde la desvitrificación se lleva a cabo primero colocando las muestras a desvitrificar en un recipiente con N<sub>2</sub> líquido y después introduciendo tres pajuelas de 0,25 ml con muestra en un tubo con 5 ml de medio de desvitrificación incubado a una temperatura que oscila de 36,5 a 37,5 °C en un bloque de calefacción.

2. Método para la criopreservación de espermatozoides de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el crioprotector no permeable de la etapa (b) es sacarosa.

30 3. Método para la criopreservación de espermatozoides de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cantidad final de espermatozoides en la etapa (c) se ajusta en un intervalo de  $0,5 \times 10^6$  a  $1,8 \times 10^6$ .

4. Método para la criopreservación de espermatozoides de acuerdo con la reivindicación 1, en donde durante la etapa de vitrificación de la etapa (d) el material termoconductor del receptáculo es plástico.

5. Método para la criopreservación de espermatozoides de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha sumersión en N<sub>2</sub> líquido de la etapa (e) se hace durante 5 segundos.