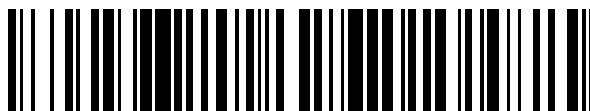


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 279**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

A61N 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2014** **E 14380026 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017** **EP 2997823**

54 Título: **Procedimiento para la mejora de la calidad en espermatozoides de mamíferos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2018

73 Titular/es:

**INSTRUMENTS UTILS DE LABORATORI GENIUL,
SL (100.0%)
Rambla Sant Nebridi, 22, Edifici Gaia
08222 Terrassa, Barcelona ES**

72 Inventor/es:

**CODONY IGLESIAS, FRANCESC y
RODRÍGUEZ GIL, JUAN ENRIQUE**

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 663 279 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

Procedimiento para la mejora de la calidad en espermatozoides de mamíferos

5 Campo de la técnica

La presente invención concierne a una metodología de tratamiento de fluidos seminales de mamíferos no basada en reactivos químicos, que tiene como objetivo incrementar la fertilidad del fluido seminal mediante, pero no únicamente, la activación de la movilidad de los espermatozoides contenidos en dicho fluido, su resistencia al estrés y en general mejorando la viabilidad del espermatozoide.

10

Esta metodología se basa en el tratamiento mediante exposición a una radiación electromagnética (luz visible) de un envase que contiene el fluido seminal. Las condiciones de tratamiento se han optimizado a unos valores de longitud de onda, tiempo y dosis determinado, en un entorno isotérmico.

15

La presente invención se enmarca en el campo de las técnicas de reproducción asistida de mamíferos.

Esta invención comprende un procedimiento en que todas las variables de exposición han sido verificadas y optimizadas, y un equipo diseñado para llevar a cabo este proceso sobre unos envases, cánulas, jeringas, tubos de ensayo o sistemas análogos usados en los pasos previos a la inseminación

20

Estado de la técnica anterior

La viabilidad, el vigor y la movilidad espermática describen la funcionalidad del espermatozoo para desplazarse de manera adecuada hacia el óvulo. Estos factores están directamente relacionados con la calidad del esperma y son mucho más determinantes para conseguir una fecundación, que la carga de esperma total. El espermatozoo que no tiene una movilidad suficiente o adecuada no llega al óvulo y este no podrá ser fecundado de manera natural.

25

La migración del espermatozoo a través del tracto reproductivo femenino (fertilización interna) o en fluidos sintéticos (fertilización externa) para llegar al óvulo es clave para conseguir una fertilización exitosa. Por otro lado también es necesaria la movilidad del espermatozoo para atravesar las matrices extracelulares que rodean el óvulo.

30

La movilidad del espermatozoo es activada por cambios fisiológicos específicos. Que pueden variar de una especie a otra. Como por ejemplo cambios de pH, de concentración de iones de Calcio y de ligandos específicos como el Camp.

35

Sin intervención tecnológica, los espermatozoos, con bajo vigor, no motiles o con motilidad anormal no conseguirán fertilizar el óvulo, esta es una de las principales causas de sub-fertilidad o infertilidad.

40

En los procedimientos de inseminación artificial se introduce en el tracto reproductor de la hembra la suspensión seminal. En el ámbito de tratamiento de infertilidad en humanos hay una capacitación previa y selección de aquellos espermatozoos con movilidad, que posteriormente son introducidos directamente en el útero.

Con independencia del tipo de espermatozoide de mamífero a tratar, el objeto de esta patente es incrementar la movilidad de los espermatozoides por tratamientos no químicos, basados en la exposición a condiciones determinadas de luz visible.

45

En la actualidad existen diferentes protocolos de laboratorio usados para realizar la suspensión seminal, la capacitación espermática, y si aplica, la selección de las células que presenten movilidad adecuada. En general estas suspensiones se preparan a concentraciones iónicas y de nutrientes determinadas, así como a un pH específico.

50

La patente US 5,453,354 da a conocer una macromolécula de naturaleza proteínica que activa la motilidad del esperma y el correspondiente procedimiento para su preparación mediante purificación de la macromolécula a partir de fluidos extracelulares.

55

La patente US 7,780,230 proporciona una composición que comprende un extracto citoplásmico, purificada a partir de huevos de *Xenopus laevis*, que es capaz de soportar la activación de esperma humano y la replicación completa de un genoma de esperma humano.

60

La patente US 6,309,815 proporciona un método y una composición para la ampliación de la viabilidad de los espermatozoides inmóviles. En el método, se recoge el esperma y se trata con una solución tampón de almacenamiento para inhibir sustancialmente la movilidad de los espermatozoides, seguidamente se almacena el semen durante un período de tiempo y a una temperatura determinada y finalmente se reactiva el esperma para la motilidad normal, mediante la mezcla de los espermatozoides inhibidos con un tampón de activación.

65

Por otro lado, la respuesta a diferentes tipos de luz, en esperma de carnero y de peces (tilapia) fue publicada en el 2005 [1], detectándose diferentes tipos de respuesta en función del tipo de esperma y del tipo de luz. Siendo las conclusiones que los tratamientos in vitro de semen de mamíferos (carnero) deberían de hacerse en ausencia de luz o bajo luz roja, en la que se detectó un ligero aumento de la movilidad.

Recientemente, se han publicado estudios en los que se analiza la respuesta del espermatozoo a la luz visible en general (todo el espectro) y los posibles mecanismos celulares implicados [2]. En este trabajo se concluía que la radiación por luz durante cortos periodos de tiempo causaba incrementos significativos de la movilidad, sin especificar un rango concreto del espectro visible (se refiere a todo) ni unas cantidades de energía determinadas.

La primera aproximación a la activación de la movilidad de los espermatozoides de mamíferos con longitudes de onda específicas se realizó con semen de perro [3,4] y de búfalo [5], a 655nm y 532 nm respectivamente. En el primer caso se informa de una relación proporcional entre el tipo de luz y la dosis con la movilidad y en el segundo caso se validan condiciones de exposición claras, mediante sistemas de luz láser. En este último trabajo se sugiere la posibilidad de usar la luz láser como una técnica para el mejoramiento in situ de la calidad del semen para optimizar las condiciones de la inseminación artificial.

Si bien existen evidencias que sugieren que la fototerapia puede tener aplicabilidad en las terapias de inseminación artificial en mamíferos, la mayoría de los estudios no pasan de acciones sobre suspensiones seminales y de la confirmación de cierto incremento limitado de movilidad, pero sin entrar en valorar si otros parámetros importantes para determinar la calidad seminal se ven afectados y si realmente eso se traduce en el incremento de la probabilidad de gestación en estudios de campo ni de que manera debería aplicarse a nivel de equipos en condiciones reales.

La patente US 6 379 939 describe un método para incrementar la capacidad fertilizante de células espermáticas de un mamífero, en particular humano, y propone irradiar dichas células espermáticas con luz en el rango visible ampliado (300 a 1000 nm) con una intensidad de 1 a 1000 mW/cm², en donde dicha luz no está producida por un láser y durante un período de tiempo de entre 0.5 a 10 minutos.

El documento científico Hussein Z M, y otros: "The effect of diode laser and light emitting diode on the bacterial contamination of semen medium for artificial insemination" describe un procedimiento óptico desarrollado para la inhibición del crecimiento bacteriano en semen que contiene un extensor de medio utilizando un láser de diodo (DL) y un diodo emisor de luz (LED) comercial barato. Ciertas longitudes de onda y tiempos de exposición adecuados para el procedimiento de inseminación artificial son óptimos para reducir el crecimiento bacteriano con un efecto mínimo significativo en la viabilidad y movilidad del semen.

Es necesario ofrecer una alternativa al estado de la técnica que cubra la falta de información detallada, a la vez que permita trabajar con sistemas ópticos no basados en láser, que tienen desventajas operativas claras: precio y posibilidad de implementación en equipos de trabajo in situ.

Breve explicación de la invención

Dados los antecedentes y resultados previos, los presentes inventores se han centrado en el estudio de la fototerapia como vía para la mejora de la calidad seminal, pero estableciendo unos protocolos in situ, en los centros de reproducción humana o granjas de cría de animales. A tal efecto y en condiciones reales se han comprobado los resultados previos de laboratorio verificando: ciclos de luz, dosis de la misma, el tiempo de exposición y dispositivos para realizar este tratamiento sobre los contenedores habituales de este tipo de fluidos y en condiciones de refrigeración o temperatura constante.

En esta invención se describen las condiciones de tratamiento de soluciones espermáticas de mamíferos, con sistemas ópticos no basados en láser. En este caso se define un rango específico de longitudes de onda, tiempos de exposición y tiempo de uso de la solución de espermatozoides en lo que la movilidad será máxima por lo que se garantiza la óptima capacidad de inseminación del mismo.

Por ello, la invención proporciona un procedimiento para incrementar la capacidad fertilizante de células de esperma, por ejemplo de esperma de mamífero, que comprende, al igual que las técnicas conocidas, irradiar dichas células de esperma con luz roja no coherente.

Sin embargo, el procedimiento de la invención está caracterizado porque la irradiación con luz roja no coherente se realiza de manera discontinua según una pauta que incluye al menos una secuencia de dos periodos de irradiación de duraciones determinadas separados por un periodo intermedio de oscuridad de duración determinada, cada uno de los periodos determinados de irradiación y de oscuridad puede tener una duración de entre 8 y 15 minutos, lo que produce resultados muy beneficiosos para el propósito deseado como es confirmado por los inventores.

Preferiblemente, dicha duración es de unos 10 minutos. Además los citados períodos de exposición y de oscuridad pueden ser de duración común o distinta.

La luz roja, por otro lado, puede tener una longitud de onda de entre unos 620 y 630 nm.

Según un ejemplo de realización, se diluye, en un diluyente, al menos una muestra seminal que incluye dichas células de espermatozoide, y se aplica la citada irradiación sobre al menos una porción de la muestra diluida. Asimismo, también se puede introducir la porción de la muestra diluida, que es al menos una, o una porción no diluida de dicha muestra seminal, en un contenedor de paredes transparentes a la longitud de onda de dicha luz roja irradiada y se puede aplicar la irradiación sobre dicho contenedor. El semen se mantiene en la oscuridad gracias a la carcasa del contenedor.

El contenedor, según un ejemplo de realización, es un tubo de ensayo o de microcentrífuga y tendrá un tamaño adecuado al tratamiento de inseminación.

Preferiblemente, la porción de muestra seminal se mantiene refrigerada, diluida o no, al menos hasta un momento inmediatamente anterior a la aplicación de irradiación de luz roja sobre la misma y/o durante dicha aplicación.

Asimismo, la porción o porciones de muestra seminal se pueden incubar en un medio isotérmico a sustancialmente 16-21°C tras ser sometidas a la citada pauta de irradiaciones de luz roja. Generalmente, la intubación se realiza durante diferentes períodos, tras cada uno de los cuales el método comprende realizar controles analíticos de la porción o porciones de muestra seminal para determinar al menos el estado de viabilidad funcional y de movilidad de los espermatozoides.

Una vez realizado el tratamiento de las células de espermatozoide conforme a los principios de esta invención, se ha verificado que el porcentaje de espermatozoides móviles y su nivel de movilidad ha mejorado con respecto a su nivel basal previo así como su capacidad de resistencia al estrés.

Siendo todos los factores que mejoran la viabilidad y movilidad de los espermatozoides móviles un factor clave en el éxito del proceso de fecundación de un óvulo, esta potenciación de la viabilidad y del vigor celular, incrementará las probabilidades de fecundación.

Breve descripción de los dibujos

Las anteriores y otras ventajas y características se comprenderán más plenamente a partir de la siguiente descripción detallada de unos ejemplos de realización con referencia a los dibujos adjuntos, que deben tomarse a título ilustrativo y no limitativo, en los que:

la Fig. 1 es un ejemplo de pequeñas muestras en tubos de 2 ml;

la Fig. 2 es un ejemplo de muestras diluidas en contenedores de 50 ml.

Descripción detallada de unos ejemplos de realización

Para confirmar las evidencias previas y la magnitud real del impacto de la fototerapia para mejorar los diferentes parámetros descriptivos de la movilidad-viabilidad celular espermática y su resistencia al estrés ambiental (considerando esto 37°C, en tiempos superiores a 1 hora), se realizaron diferentes estudios de laboratorio usando como modelo de mamífero, el semen porcino.

Se escogió trabajar con espermatozoides porcinos por ser un material fácilmente obtenible y por ser un buen modelo para extrapolar resultados a otros mamíferos, incluidos los humanos.

Se trabajó con muestras de 15 machos sanos, adultos, de edad comprendida 2-3 años y de 5 razas diferentes (Pietrain, Duroc, Large White, Landrace Belga y Landrace Inglés). Estas fueron obtenidas, mediante estimulación manual, diluidas inmediatamente en un diluyente comercial hasta una concentración espermática final de 3×10^7 espermatozoides/ml en un volumen final de 90 mL y conservadas a 16-17°C.

Dos alícuotas de 1,5 mL se depositaron en tubos de microcentrífuga, una se conservó en incubación a 16-17°C como control y la otra fue expuesta a diferentes programas de fotoestimulación mediante el dispositivo descrito en la figura 1.

Los programas de fotoestimulación realizados se detallan a continuación:

(A) 10 minutos de exposición a luz roja, 10 minutos de descanso y 10 minutos de exposición a luz roja.

(B) 15 minutos de exposición a luz roja, 10 minutos de descanso y 15 minutos de exposición a luz roja.

(C) 20 minutos de exposición a luz roja, 10 minutos de descanso y 20 minutos de exposición a luz roja.

5 Una vez realizado el tratamiento tanto las diferentes alícuotas control como las tratadas se introdujeron en un baño termostático a 37°C, incubándose diferentes tiempos (15, 30, 60 y 90 minutos) después de los cuales se realizaron los controles analíticos para determinar el estado de la viabilidad funcional y de la movilidad.

Los controles analíticos fueron:

10 1) Estimación de los porcentajes de viabilidad y de acrosomas estructuralmente intactos mediante doble tinción con Azul T/Giemsa [6]

15 2) Análisis de la motilidad espermática, mediante análisis computarizado de motilidad (CASA) midiendo los siguientes parámetros: Velocidad Curvilínea (VCL) , Velocidad Rectilínea (VSL), Velocidad lineal (VAP), Coeficiente de Linealidad (LIN), Coeficiente de Rectitud (STR) , Coeficiente de Oscilación (WOB), Amplitud media del movimiento de la cabeza (ALH), Frecuencia media de la batida de la cabeza (BCF)

20 Los resultados de 5 ensayos independientes fueron evaluados estadísticamente mediante transformación logarítmica de aquellos datos que no seguían distribución normal. Las diferencias significativas (p<0,05) se determinaron mediante el procedimiento LSMEANS del paquete estadístico SAS.

Tabla 1. Experimento 1. Diferencias significativas (*) a 90 minutos entre los controles y los tratamientos A, B y C

Test	Tratamiento		
	A	B	C
% Viabilidad	*	*	
% Acrosomas alterados	#	#	
% Motilidad total	*		*
VCL	*	*	*
VSL	*	*	
VAP	*	*	*
LIN	*	*	
STR	*	*	*
WOB		*	
ALH		*	*
BCF	*		

25 * superior al control # inferior al control

30 Estos trabajos determinaron que una dosis (tiempo de exposición a la irradiación de luz roja no coherente) de duración excesiva no tenía efecto alguno o su resultado no era óptimo, y que la respuesta positiva, en términos de mejora de la motilidad-viabilidad, estaba fuertemente relacionada con la combinación de al menos 2 exposiciones de luz roja no coherente con un periodo intermedio de oscuridad en ambos casos de duraciones bien determinadas. De manera general los tratamientos A y B mostraban un claro efecto protector, mejorando sustancialmente la supervivencia espermática, siendo en el tratamiento A los valores obtenidos de mayor nivel que en el B. Por lo que se consideró el tratamiento A el mejor de los evaluados hasta entonces y como punto de partida para aplicación en casos reales de reproducción asistida en mamíferos.

35 Con el ánimo de verificar si el tratamiento discontinuo (con un periodo intermedio de reposo) tenía una clara mejora sobre un tratamiento equivalente pero donde la luz fuera dosificada de manera continua, se valoraron los siguientes protocolos de tratamiento con los mismos materiales y métodos anteriormente descritos.

Los programas de fotoestimulación fueron:

40 (de nuevo el A y un control no expuesto)

(D) 10 minutos de exposición a luz roja,

45 (E) 20 minutos de exposición a luz roja

(F) 30 minutos de exposición a luz roja

50 (G) 45 minutos de exposición a luz roja

Tabla 2. Experimento 2. Diferencias significativas (*) a 90 minutos entre los controles y los tratamientos A, D, E, F y G

Test	Tratamiento				
	A	D	E	F	G
% Viabilidad	*				
% Acrosomas alterados	#				
% Motilidad total	*		#	#	#
VCL	*	*			
VSL	*		#	#	#
VAP	*				#
LIN	*		#	#	
STR	*				
WOB					
ALH					#
BCF	*	*	*	*	*

* superior al control # inferior al control

5 De las conclusiones de los resultados expuestos en las tablas 1 y 2 se deduce que los tratamientos discontinuos, tienen una sustancial mejora sobre las propiedades del semen de mamíferos (usando como modelo el de diferentes especies de cerdo) y que por el contrario un tratamiento continuo empeora las propiedades del semen. Siendo estas propiedades claves para la fecundidad.

10 De lo anterior se desprende que la fotoestimulación controlada con luz led roja no coherente, por ejemplo a 620-630 nm de longitud de onda en una pauta de estimulación 10-10-10 (10 minutos de irradiación, seguidos de 10 minutos de reposo y de 10 minutos más finales de irradiación) mejoran significativamente la resistencia al estrés térmico de los espermatozoides porcinos previamente diluidos en un diluyente comercial de refrigeración a 16-17 °C empleado rutinariamente en la inseminación artificial en granja .

15 Esta pauta de fotoestimulación también provoca una mejora en la capacidad de estos mismos espermatozoides en alcanzar la reacción acrosómica "in vitro " inducida por progesterona. Estos resultados in vitro sugirieron que la fotoestimulación tiene un efecto significativo sobre los espermatozoides, mejorando no sólo la capacidad de resistencia hacia el estrés ambiental, sino también la capacidad de penetración ovocitaria. Ambos efectos podrían tener, en su conjunto y como resultado final, una mejora en la capacidad fecundante de los espermatozoides fotoestimulados, con la consecuente mejora de los resultados de fertilidad y prolificidad " in vivo ", especialmente en condiciones en las que el estrés ambiental las pudiera menoscabar.

20 Un ejemplo de aplicación sería en granja porcina donde, la temperatura ambiental, está actuando en detrimento de la capacidad reproductiva.

25 Un segundo ejemplo de aplicación sería en el ámbito de la reproducción humana donde la falta de movilidad por causas ambientales y/o orgánicas, se relaciona con la infertilidad masculina.

30 Siendo el cerdo un animal cercano metabólicamente a los humanos, y aceptado como modelo en diferentes ámbitos de la medicina, y siendo éticamente impracticable la demostración práctica del segundo ejemplo, sin al menos haberlo demostrado antes con un modelo animal, se ha verificado la validez de esta aproximación en mamíferos usando el cerdo como modelo.

35 En un estudio realizado en granja reproductiva, siguiendo el procedimiento de fotoestimulación anteriormente descrito sobre dosis seminales comerciales y usando el equipo anteriormente descrito (Figura 2) se trataron por inseminación post-cervical 7 lotes diferentes de hembras en celo, en total n=195. De manera paralela a cada lote de hembras tratadas con suspensión seminal fotoestimulada (n=78) un segundo lote fue inseminado con suspensiones sin tratar (n=117). En la tabla siguiente se pueden ver los resultados:

Tabla 3. Porcentajes de fertilidad para el grupo control y el grupo inseminado con dosis comerciales fotoestimuladas.

Lote	Control		Dosis seminales Fotoestimuladas	
	n	% fertilidad	n	% fertilidad
1	15	93,3	13	100,0
2	25	96,00	10	100,0
2	18	100,00	13	100,0
4	14	92,85	13	92,3
4	15	100,00	12	100,0

6	16	93,33	12	100,0
7	16	93,75	11	90,91
8	37	91,91	19	94,74
9	19	84,23	14	100
Total	175	93,93	117	97,55
n , número de hembras en gestación				
% , porcentaje de fertilidad sobre el total del grupo				

5 Los resultados de fertilidad con un intervalo de confianza del 95% son de (90,85-97,01) % para los controles y de (95,07-100) % para las hembras tratadas. Un test estadístico de comparación de medias (prueba T, de una cola, de datos apareado) da una $p=0,0448$ que demuestra que existen diferencias significativas entre los 2 grupos a pesar de los altos porcentajes de fertilidad en el grupo control que denotan que el estudio se ha realizado en granjas de reproducción muy eficientes y con un elevado porcentaje de fertilidad

10 Hay que remarcar que una vez terminada la gestación, sobre un lote de 100 hembras una diferencia de 2 hembras con fertilización positiva equivale (con un promedio de 8 crías por individuo) un a diferencia de al menos 16 crías por lote que tiene un claro efecto multiplicativo sobre el rendimiento de la explotación ganadera.

15 Los datos de número de lechones nacidos vivos por hembra gestada con un IC 95% fueron de 13,73 (12,82-14,45) para el grupo control y 14,31 (13,29-15,33) para las tratadas con semen fotoestimulado Estos resultados demuestran que una vez en gestación, la utilización de semen fotoestimulado no reduce la prolificidad de las mismas.

El alcance de protección de la invención se encuentra definido por las siguientes reivindicaciones.

Referencias

- 20 [1] T. Zan-Bar, B. Bartoov, R. Segal, R. Yehuda, R. Lavi, Dr. R. Lubart, and R.R. Avtalion. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2005, 23(6): 549-555. doi:10.1089/pho.2005.23.549.
- [2] Shahr S, Wiser A, Ickowicz D, Lubart R, Shulman A, Breitbart H. *Hum. Reprod.* (2011) 26 (9): 2274-2282. doi: 10.1093/humrep/der232
- 25 [3] Corral-Baqués MI, Rivera MM, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Rigau J. *Lasers Med Sci.* 2009 Sep;24(5):703-13.
- [4] Corral-Baqués MI, Rigau T, Rivera M, Rodríguez JE, Rigau J. *Lasers Med Sci.* 2005;20(1):28-34
- 30 [5] Abdel-Salam Z, Dessouki SH, Abdel-Salam SA, Ibrahim MA, Harith MA. *Theriogenology*. 2011 Apr 1; 75(6):988-94.
- [6] Rodríguez-Gil, J.E. i Rigau, T 1995 *An. Rep. Sci.*, 39: 141-146.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para incrementar la capacidad fertilizante de células de esperma, que comprende irradiar dichas células de esperma con luz roja no coherente, caracterizado porque dicha irradiación se realiza con luz roja no coherente y de una manera discontinua, según una pauta que incluye al menos una secuencia de dos periodos de irradiación de las células de esperma de duración determinada, separados por un periodo intermedio de oscuridad de duración determinada, donde cada uno de dichos periodos determinados de irradiación y de oscuridad tiene una duración de entre 8 y 15 minutos.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la duración de dichos dos periodos de irradiación y del período intermedio de oscuridad es la misma.
- 15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, donde cada uno de dichos periodos determinados de irradiación y de oscuridad tiene una duración de 10 minutos, y la duración de dichos dos periodos de irradiación y del período intermedio de oscuridad es la misma.
- 20 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichos periodos de irradiación y de oscuridad son de duración distinta.
- 25 5.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha luz roja tiene una longitud de onda de entre 620 y 630 nm.
- 30 6.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende diluir en un diluyente al menos una muestra seminal que incluye dichas células de esperma, y aplicar dicha irradiación sobre al menos una porción de dicha muestra diluida.
- 35 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, que comprende introducir dicha porción, que es al menos una, o una porción no diluida de dicha muestra seminal, en un contenedor de paredes transparentes a la longitud de onda de dicha luz roja irradiada y aplicar dicha irradiación sobre dicho contenedor.
- 40 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, donde dicho contenedor es un tubo de ensayo o de microcentrífuga de tamaño adecuado para reproducción humana o animal.
- 45 9.- Procedimiento según la reivindicación 6 a 8, que comprende mantener refrigerada a dicha porción de muestra seminal, diluida o no, que es al menos una, al menos hasta un momento inmediatamente anterior a la aplicación de irradiación de luz roja sobre la misma y/o durante dicha aplicación.
- 10.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende incubar en un medio isotérmico a sustancialmente 16-21°C a la porción o porciones de muestra seminal tras ser sometidas a dicha pauta de irradiaciones de luz roja.
- 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque comprende realizar dicha incubación durante diferentes periodos, tras cada uno de los cuales el método comprende realizar controles analíticos de la porción o porciones de muestra seminal para determinar al menos el estado de viabilidad funcional y de movilidad de los espermatozoides.
- 12.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichas células de esperma son de esperma de mamífero.

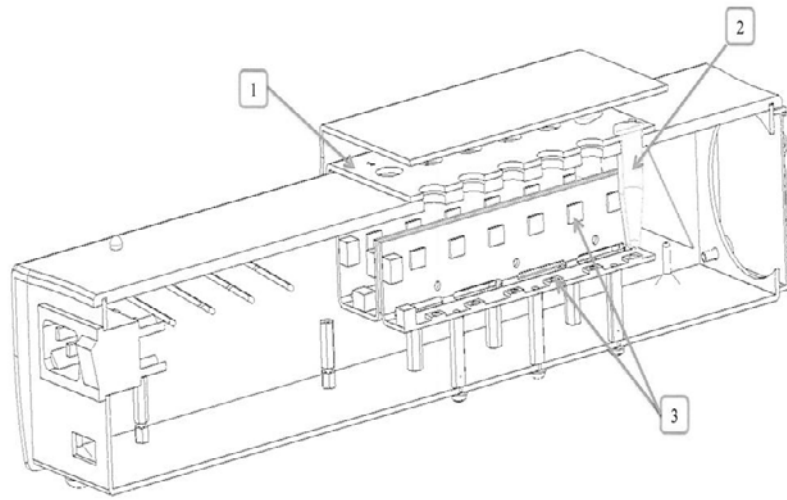


Figura 1

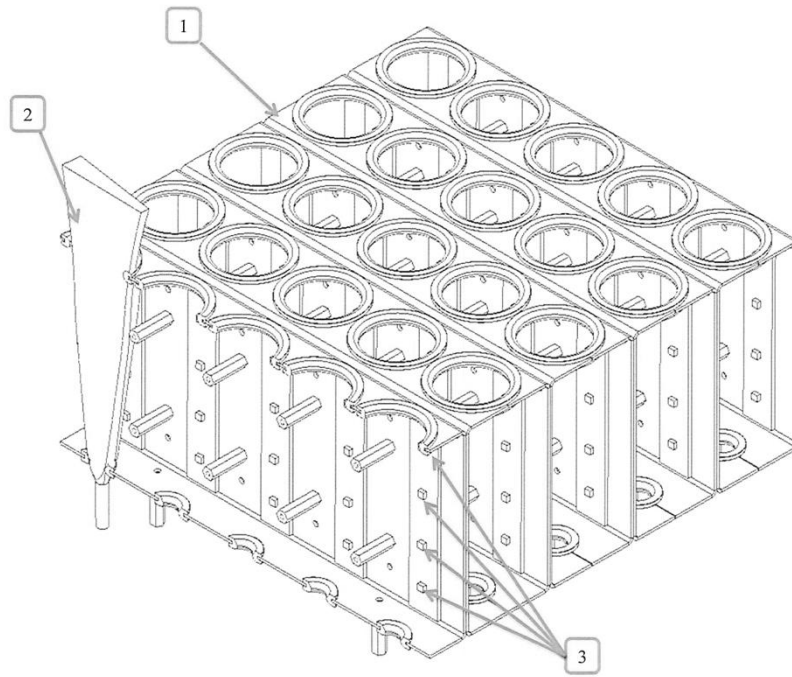


Figura 2