

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 630**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2007** **PCT/US2007/013884**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2007** **WO07146344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2007** **E 07809520 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** **EP 2043431**

54 Título: **Medios crioprotectores de esperma**

30 Prioridad:

12.06.2006 US 812833 P

29.08.2006 US 840744 P

25.10.2006 US 854501 P

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

15.06.2018

73 Titular/es:

THE JACKSON LABORATORY (100.0%)

600 MAIN STREET

BAR HARBOR, ME 04609, US

72 Inventor/es:

OSTERMEIER, G., CHARLES;

FARLEY, JANE, S;

TAFT, ROBERT y

WILES, MICHAEL, V.

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 672 630 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

Medios crioprotectores de esperma

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Los revolucionarios avances en la investigación del genoma y la capacidad de crear cepas genéticamente específicas de ratones han dado lugar a un aumento exponencial en el número de cepas de ratón disponibles para la investigación biomédica. Estas cepas recién creadas, en particular aquellas en las que la cepa o mutación pueden mantenerse por germoplasma haploide, se conservan de manera más eficiente mediante la congelación y el almacenamiento de los espermatozoides.

[0002] Las composiciones para usar en la conservación criogénica de esperma que comprenden al menos un crioprotector, al menos un protector de membrana y al menos un captador de radicales libres son conocidas en la técnica y se describen en los documentos EP 1 051 907 A1, WO 02/054864 A1, WO 98/00125 A1, WO 97/14785 A1, WO 2006/051200 A1;

BILODEAU J-F ET AL, "Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen", THERIOGENOLOGY, LOS ALTOS, CA, US, (20010715), vol. 56, no. 2, páginas 275 - 286;

LINDEMANN C B ET AL, "AN INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF CERTAIN ANTIOXIDANTS IN PRESERVING THE MOTILITY OF REACTIVATED BULL SPERM MODELS", BIOLOGY OF REPRODUCTION, SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, CHAMPAIGN, IL, US, (1988), vol. 38, no. 1, páginas 114 - 120;

KUMAR, SATISH ET AL, "Effect of additives and their combinations on storageability and freezability of bovine semen in milk diluents", INDIAN VETERINARY MEDICAL JOURNAL, 20(2), 108-113 (1996);

SINGH, N. P. ET AL, "Comparison of cysteine fortified citric acid whey with tris and egg yolk citrate extenders on cryopreservation of buffalo semen", DATABASE CAPLUS, CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US, INDIAN JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, 49(1), 24-28 CODEN: IJDSAI; ISSN: 0019-5146 (1996);

RAO, B. ET AL, "Improved recovery of post-thaw motility and vitality of human spermatozoa cryopreserved in the presence of dithiothreitol", CRYOBIOLOGY, 21(5), 536-41 (1984);

ROCA, JORDI ET AL, "Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene", JOURNAL OF ANDROLOGY, 25(3), 397-405 (2004);

FOOTE, R. H., "Fertility of bull semen frozen with .beta.-amylase, .beta.-glucuronidase, and catalase", JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, 59(11), 2014-17 (1976);

STOSS, J. ET AL, "Short-term and cryopreservation of rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson) sperm", ANNALES DE BIOLOGIE ANIMALE, BIOCHIMIE, BIOPHYSIQUE, 18(4), 1077-82 (1978);

SCHMIDT, DIETER ET AL, "Freezing of boar semen. 1. Influence of cryoprotectives on sperm survival", ARCHIV FUER TIERZUCHT, 17(2), 85-94 (1974);

MAHADEVAN, M. ET AL, "Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa", ANDROLOGIA, 15(4), 355-66 (1983);

SNEDEKER, W. H. ET AL, "Dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent for freezing bovine semen", JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE, 30(6) (1970);

BAUMBER JULIE ET AL, "Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants", AMERICAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH, vol. 66, no. 5, páginas 772 - 779;

NEILD D M ET AL, "Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa", MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, (200510), vol. 72, no. 2, páginas 230 - 238.

[0003] Los procedimientos empleados actualmente para la crioconservación de esperma de ratón muestran un éxito moderadamente variable, dependen de la constitución genética del hombre y tiene, por lo tanto, en general, se han considerado inadecuados para la conservación segura de la mayoría de cepas de ratón endogámicas. Se necesitan procedimientos adicionales para la crioconservación de esperma que se vean menos afectados negativamente por antecedentes genéticos.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0004] Los medios y procedimientos de la presente invención, que incluyen procedimientos para conservar criogénicamente esperma (por ejemplo, esperma de mamíferos, incluyendo mamíferos no humanos, tales como roedores, incluyendo ratones y ratas) son de gran interés debido a que consistentemente aumentan las tasas de éxito obtenidos con esperma crioconservado. Tal como se utiliza en el presente documento, el término esperma se refiere a esperma y espermatozoides.

[0005] En una primera realización, la presente invención proporciona un procedimiento para conservar criogénicamente esperma, que comprende añadir al esperma, antes de la crioconservación, una composición que comprende al menos un crioprotector, al menos un protector de membrana y monotioglicerol.

[0006] En una segunda realización, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de esperma que tiene mayor capacidad de fecundación después de la conservación criogénica, que comprende: (a) combinar el

esperma con una composición, en la que la composición comprende al menos un crioprotector, al menos un protector de membrana y monotioglicerol, produciendo de esta manera una combinación; y (b) crioconservar la combinación, produciendo de este modo una combinación crioconservada que comprende esperma crioconservado.

5 **[0007]** En una tercera realización, la presente invención proporciona una composición criogénicamente conservada que comprende (a) esperma de mamífero no humano y (b) una composición para la conservación criogénica de esperma, en la que la composición comprende al menos un crioprotector, al menos un protector de membrana y monotioglicerol.

10 **[0008]** En una cuarta realización, la presente invención proporciona una composición para la conservación criogénica de esperma, que comprende al menos un crioprotector, al menos un protector de membrana y monotioglicerol, preferiblemente en una concentración de 50 micromolar a 50.000 micromolar.

15 **[0009]** En una quinta realización, la presente invención proporciona un kit para su uso en la crioconservación de esperma que comprende la composición de la cuarta realización o que comprende por separado los siguientes componentes: (a) al menos un crioprotector; (b) monotioglicerol; y (c) al menos un protector de membrana.

[0010] En una sexta realización, la presente invención proporciona un recipiente que comprende la composición de la cuarta realización, el kit de la quinta realización.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011]

La Figura 1 muestra que el monotioglicerol aumenta la fertilidad del esperma de C57BL/6J crioconservado; la figura 2 ilustra que GSH mejora la fertilidad del esperma de C57BL/6J crioconservado; la figura 3 ilustra que MTG reduce las ROS en esperma crioconservado de ratones C57BL/6J (B6) y BALB/cByJ (BALB/cBy); la figura 4 ilustra una mejora de la capacidad de fecundación de esperma después de la crioconservación; las Figuras 5A-5G demuestran que la presencia de monotioglicerol (MTG) durante la crioconservación de esperma bovino mejora la viabilidad después de la descongelación. El esperma de tres colecciones de cada uno de 6 toros diferentes fue congelado en presencia de MTG a las concentraciones indicadas en los ejes x. Para cada colección, se crearon dos conjuntos de tres tubos cada uno y se analizaron dos veces para la viabilidad del esperma. Las diferencias en la viabilidad celular del esperma entre los tratamientos se determinaron usando análisis de varianza en porcentajes transformados por arcoseno y comparaciones planificadas previamente al control de no MTG utilizando el procedimiento de Dunnett. El panel A ilustra la media y los errores estándar de los 6 toros, mientras que los paneles B a G ilustran el porcentaje de esperma viable para los individuos. Se observó una afectación del tratamiento general según las diferencias dentro de los toros tal que se muestra en los paneles B, C, y D; la figura 6 compara monotioglicerol congelado frente a fresco y sus efectos sobre la tasa de fecundidad; las figuras 7A y 7B muestran resultados de las evaluaciones llevadas a cabo para identificar captadores de radicales libres adecuados; y la figura 8 muestra los resultados del trabajo en el que el esperma de C57BL/6J se congeló en rafinosa al 18% suplementado con 477 μ M de monotioglicerol. El esperma se descongeló y se utilizó para la fecundación in vitro utilizando ovocitos de hembras C57BL/6J superovuladas. Con esta estrategia se obtuvo esperma viable y se fecundaron el 30% de los ovocitos.

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0012] Se describe en el presente documento una composición, referida como medios crioprotectores o medios de crioprotección, útil para la crioconservación de esperma de una amplia variedad de mamíferos y no mamíferos. En una realización, los medios crioprotectores se denominan CPM y comprenden un crioprotector; un protector de membrana que estabiliza o ayuda a la estabilización de membranas del esperma; y monotioglicerol como un captador de radicales libres (un agente reductor, un antioxidante). Tal como se usa en el presente documento, con referencia a CPM, CP-FRS y FRS (todos los tipos de medios crioprotectores descritos en este documento), el término "captador de radicales libres" se refiere a una sustancia o agente que elimina o inactiva los radicales libres, tal como una sustancia o agente añadido a una mezcla con el fin de eliminar o inactivar los radicales libres. Tal como se usa en el presente documento, con referencia a CPM, CP-FRS y FRS (todos los tipos de medios crioprotectores descritos en este documento), el término "agente reductor" se refiere a un elemento o un compuesto que, en una reacción redox (reducción-oxidación), reduce otra especie (elemento o compuesto). Tal como se usa en el presente documento, con referencia a CPM, CP-FRS y FRS (todos los tipos de medios crioprotectores descritos en este documento), el término "antioxidante" se refiere a una sustancia o agente que reduce el daño oxidativo a las células y biomoléculas. La composición comprende típicamente adicionalmente agua en cantidad suficiente para mantener la funcionalidad del esperma. Alternativamente, se puede utilizar un líquido o disolvente que no sea agua, tal como solución salina o un tampón fisiológico, tal como fosfato (PBS), bicarbonato, HEPES, MOPS, CHES, MES, CAPS o Tris, solos o en combinación con agua.

[0013] Se describen además medios crioprotectores que incluyen un crioprotector y un captador de radicales libres y

no incluyen un protector de membrana. Los medios crioprotectores, referidos en el presente documento como CP-FRS, son útiles para la crioconservación de esperma de una amplia variedad de mamíferos y no mamíferos. En una realización adicional, los medios crioprotectores incluyen un captador de radicales libres y no incluyen un crioprotector o un protector de membrana. En estas realizaciones, la composición comprende típicamente adicionalmente agua en cantidad suficiente para mantener la funcionalidad del esperma, así como componentes adicionales, tal como se describe en el presente documento.

[0014] La composición se puede utilizar para la crioconservación de esperma, incluyendo esperma de mamíferos, tal como esperma de roedores (por ejemplo, ratón, rata), bovino, canino, felino, porcino, cabra, oveja, conejo, caballo, camélidos, animal doméstico o de compañía y humano, así como esperma de animales no mamíferos, tal como esperma de aves (por ejemplo, pollo, pavo, ave doméstica o de compañía) y peces (producidos para el consumo, peces domésticos o de compañía). Los medios crioprotectores son útiles para la crioconservación de esperma obtenida de vertebrados de todo tipo, tales como mamíferos, incluyendo vertebrados modificados genéticamente de todos los tipos, incluyendo mamíferos modificados genéticamente (por ejemplo, esperma obtenido de roedores (por ejemplo, ratón, rata), bovino, canino, felino, porcino, cabra, oveja, conejo, caballo, camélidos, otro animal doméstico o de compañía) modificados genéticamente, así como no mamíferos modificados genéticamente (tal como esperma obtenida de aves (por ejemplo, pollo, pavo, ave de compañía) y peces (producidos para el consumo, peces de compañía) genéticamente modificados). La composición descrita en el presente documento se puede utilizar en cualquier procedimiento para conservar criogénicamente esperma.

[0015] Se describe además un procedimiento para conservar criogénicamente esperma (producir esperma conservado criogénicamente) que comprende (a) combinar esperma a conservar criogénicamente y una composición que comprende al menos uno de los siguientes: (1) un crioprotector; (2) un protector de membrana que estabiliza o ayuda en la estabilización de las membranas del esperma; y (3) un captador de radicales libres (tal como un agente reductor o un antioxidante), para producir una combinación (combinación medios crioprotectores-esperma, también referida como la combinación inicial o la combinación a crioconservar) y (b) someter la combinación a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación, produciendo de este modo una combinación conservada criogénicamente que comprende esperma conservado criogénicamente.

[0016] En una realización, el procedimiento para conservar criogénicamente esperma (producir esperma conservado criogénicamente) comprende (a) combinar esperma a conservar criogénicamente y una composición, referida como CPM, que comprende: (1) un crioprotector; (2) un protector de membrana que estabiliza o ayuda en la estabilización de las membranas del esperma; y (3) monoglicérol como captador de radicales libres (un agente reductor o un antioxidante), para producir una combinación (combinación medios crioprotectores-esperma, también referida como la combinación inicial o la combinación a crioconservar) y (b) someter la combinación a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación, produciendo de este modo una combinación conservada criogénicamente que comprende esperma conservado criogénicamente.

[0017] La combinación inicial (la combinación a crioconservar) se produce antes de la crioconservación y se puede someter a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación inmediatamente después de la producción o dentro de un período de tiempo limitado después de que se produce. La crioconservación puede llevarse a cabo en cualquier momento después de la producción que no afecte adversamente a la viabilidad del esperma, tal como, para esperma del ratón, en cualquier momento dentro de aproximadamente 90 minutos después de que se produce. El esperma resultante es esperma crioconservado que muestra consistentemente mejor potencial de fecundación que el potencial de fecundación del esperma crioconservado obtenido mediante procedimientos y medios disponibles actualmente. La conservación se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente más 4°C a aproximadamente menos 200°C. En realizaciones específicas, la crioconservación se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente menos 80°C a aproximadamente menos 200°C. En todas las realizaciones descritas en este documento, el esperma crioconservado resultante se puede almacenar indefinidamente a una temperatura apropiada, conocida por los expertos en la técnica (por ejemplo, a temperaturas que van desde aproximadamente menos 80°C a aproximadamente menos 200°C).

[0018] La capacidad o potencia de fecundación del esperma se puede evaluar usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, tales como mediante un procedimiento in vitro (por ejemplo, mediante la evaluación de la capacidad de fecundar ovocitos con los que se combinan/incuban (su capacidad para formar embriones de 2 células, por ejemplo)) y/o mediante un procedimiento in vivo (por ejemplo, mediante la evaluación de la producción de descendencia por las hembras en las cuales se implantan los ovocitos fecundados). El procedimiento se puede utilizar para conservar criogénicamente esperma obtenida de vertebrados, incluyendo mamíferos y no mamíferos, de todos los tipos, incluyendo esperma obtenido de vertebrados modificados genéticamente (por ejemplo, mamíferos modificados genéticamente, tales como roedores (por ejemplo, ratón, rata), bovino, canino, felino, porcino, cabra, oveja, conejo, caballo, camélidos, animal doméstico o de compañía) modificados genéticamente, y no mamíferos (tales como aves genéticamente modificados (por ejemplo, pollo, pavo, aves de compañía) y peces (producidos para consumo, peces de compañía) modificados genéticamente. Consulte la Tabla 1, que es una lista de los animales para los que puede utilizarse la presente invención.

[0019] En ciertas realizaciones, el procedimiento para conservar criogénicamente esperma comprende: (a) combinar

esperma a conservar criogénicamente y una composición que comprende (1) un crioprotector, tal como uno o más azúcares (por ejemplo, rafinosa, lactosa), glicerol y/o propilenglicol; (2) un protector de membrana, que es una macromolécula o una mezcla de macromoléculas que estabiliza o ayuda en la estabilización de membranas del esperma (por ejemplo, leche o leche en polvo, tal como leche desnatada o leche desnatada en polvo; una proteína en la leche, una proteína de la leche o componente de la misma); y (3) monotioglicerol como captador de radicales libres, para producir una combinación (combinación de medios crioprotectores-esperma); y (b) someter la combinación a las condiciones que dan lugar a la crioconservación del esperma en la combinación, produciendo de este modo una combinación crioconservada que comprende esperma crioconservado. La macromolécula o macromoléculas utilizadas pueden ser cualquier macromolécula descrita en el presente documento o cualquier otra macromolécula que tenga las características deseadas. La combinación inicial (la combinación a crioconservar) se produce antes de la crioconservación y se puede someter a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación inmediatamente después de que se produce o dentro de un periodo limitado después de que se produce. La crioconservación se puede llevar a cabo en cualquier momento después de la producción que no afecta de manera significativamente adversa a la viabilidad del esperma. Por ejemplo, con esperma de ratón o rata, la crioconservación puede llevarse a cabo en cualquier momento dentro de aproximadamente 90 minutos después de que se produce. Como ejemplo adicional, la crioconservación de esperma humano o bovino puede llevarse a cabo hasta aproximadamente 24 horas después de la producción de la combinación. La conservación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente más 4°C a aproximadamente menos 200°C. En realizaciones específicas, la crioconservación se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente menos 80°C a aproximadamente menos 200°C. Antes de incubar el esperma con ovocitos, el esperma se descongela y también se puede lavar. En todas las realizaciones descritas en este documento, el esperma crioconservado resultante se puede almacenar indefinidamente. El esperma resultante es esperma crioconservado que muestra consistentemente mejor potencial de fecundación que el potencial de fecundación de esperma crioconservado obtenido utilizando procedimientos y medios disponibles actualmente.

[0020] La potencia o capacidad de fecundación del esperma se puede evaluar usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, tales como in vitro, mediante la evaluación de la capacidad de fecundar ovocitos con los que se combinan/incuban (su capacidad para formar embriones de 2 células, por ejemplo) y/o mediante la evaluación in vivo de la producción de descendencia por las hembras en las cuales se implantan los ovocitos fecundados. En el caso de esperma humano, la potencia o capacidad de fecundación se puede evaluar usando procedimientos disponibles, tales como un ensayo funcional, incluyendo, pero no limitado a, un ensayo de motilidad, un ensayo de viabilidad, un ensayo de hemizona (unión del esperma a la zona pelúcida) o penetración de esperma en ovocitos de hámster libres de zona.

[0021] En una realización específica, el procedimiento para conservar criogénicamente esperma comprende: (a) combinar esperma a conservar criogénicamente y una composición que comprende (1) un crioprotector, que es uno o más azúcares (por ejemplo, rafinosa, lactosa); (2) un protector de membrana, que es una macromolécula, tal como una proteína (por ejemplo, leche o una proteína contenida en la leche; leche desnatada o una proteína contenida en la leche desnatada, yema de huevo o una proteína contenida en la yema de huevo) que estabiliza o ayuda en la estabilización de membranas del esperma; y (3) monotioglicerol como captador de radicales libres, para producir una combinación (combinación de medios crioprotectores-esperma); y (b) someter la combinación a las condiciones que dan lugar a la crioconservación del esperma en la combinación, produciendo de este modo una combinación crioconservada que comprende esperma crioconservado. La combinación inicial (la combinación a crioconservar) se produce antes de la crioconservación y se puede someter a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación inmediatamente después de que se produce o dentro de un periodo limitado después de que se produce. La crioconservación se puede llevar a cabo en cualquier momento después de la producción que no afecta de manera significativamente adversa a la viabilidad del esperma. Por ejemplo, con esperma de ratón, la crioconservación puede llevarse a cabo en cualquier momento dentro de aproximadamente 90 minutos después de que se produce. La conservación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente más 4°C a aproximadamente menos 200°C. En realizaciones específicas, la crioconservación se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente menos 80°C y aproximadamente menos 200°C. En todas las realizaciones descritas en este documento, el esperma crioconservado resultante se puede almacenar indefinidamente. El esperma resultante es esperma crioconservado que muestra consistentemente mejor potencial de fecundación que el potencial de fecundación de esperma crioconservado obtenido utilizando procedimientos y medios disponibles actualmente. La capacidad o funcionalidad de fecundación del esperma se puede evaluar usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, tales como in vitro, mediante la evaluación de la capacidad de fecundar ovocitos con los que se combinan/incuban (su capacidad para formar embriones de 2 células, por ejemplo) y/o mediante la evaluación in vivo de la producción de descendencia por las hembras en las cuales se implantan los ovocitos fecundados. En el caso de esperma humano, la potencia o capacidad de fecundación se puede evaluar usando procedimientos disponibles, tales como un ensayo funcional, incluyendo, pero no limitado a, un ensayo de hemizona (unión del esperma a la zona pelúcida) o penetración de esperma en ovocitos de hámster libres de zona.

[0022] Se describe además un medio crioprotector que incluye un (al menos uno; uno o más) crioprotector y un (al menos uno; uno o más) captador de radicales libres y no incluye un protector de membrana. Este medio crioprotector, referido en el presente documento como CP-FRS, es útil para los mismos fines y en los procedimientos tal como se describe en el presente documento para CPM.

[0023] Se describe además un procedimiento para conservar criogénicamente esperma (producir esperma conservado criogénicamente) que comprende (a) combinar esperma a conservar criogénicamente y una composición que incluye un crioprotector y un captador de radicales libres (tal como un agente reductor o un antioxidante), para producir una combinación (combinación medios crioprotectores-esperma o combinación FRS-esperma, también referida como la combinación inicial o la combinación a crioconservar) y (b) someter la combinación a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación, produciendo de este modo una combinación conservada criogénicamente que comprende esperma conservado criogénicamente.

[0024] Se describe además un procedimiento para conservar criogénicamente esperma (producir esperma conservado criogénicamente) que comprende (a) combinar esperma a conservar criogénicamente y una composición, referida como CP-FRS, que incluye un crioprotector y un captador de radicales libres (tal como un agente reductor o un antioxidante), para producir una combinación (combinación medios crioprotectores-esperma, también referida como la combinación inicial o la combinación a crioconservar) y (b) someter la combinación a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación, produciendo de este modo una combinación conservada criogénicamente que comprende esperma conservado criogénicamente.

[0025] La combinación inicial (la combinación a crioconservar) se produce antes de la crioconservación y se puede someter a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación inmediatamente después de la producción o dentro de un período de tiempo limitado después de que se produce. La crioconservación puede llevarse a cabo en cualquier momento después de la producción que no afecte adversamente a la viabilidad del esperma, tal como, para esperma del ratón, en cualquier momento dentro de aproximadamente 90 minutos después de que se produce. El esperma resultante es esperma crioconservado que muestra consistentemente mejor potencial de fecundación que el potencial de fecundación del esperma crioconservado obtenido mediante procedimientos y medios disponibles actualmente. La conservación se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente más 4°C a aproximadamente menos 200°C. En realizaciones específicas, la crioconservación se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente menos 80°C y aproximadamente menos 200°C. En todas las realizaciones descritas en este documento, el esperma crioconservado resultante se puede almacenar indefinidamente a una temperatura apropiada, conocida por los expertos en la técnica (por ejemplo, a temperaturas que van desde aproximadamente menos 80°C a aproximadamente menos 200°C).

[0026] Los crioprotectores y capturadores de radicales libres descritos en este documento son útiles en la composición CP-FRS y procedimientos en los que se utiliza CP-FRS. En una realización adicional, los medios de crioconservación incluyen un (al menos uno, uno o más) captador de radicales libres y no incluye un crioprotector o un protector de membrana. En una realización, el procedimiento de conservar criogénicamente esperma (producción de esperma conservado criogénicamente) comprende (a) combinar esperma a conservar criogénicamente y una composición que incluye un captador de radicales libres (tal como un agente reductor o un antioxidante), para producir una combinación (combinación medios crioprotectores-esperma o FRS-esperma, también referida como la combinación inicial o la combinación a crioconservar) y (b) someter la combinación a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación, produciendo de este modo una combinación conservada criogénicamente que comprende esperma conservado criogénicamente.

[0027] Se describe además un procedimiento de conservar criogénicamente esperma (producción de esperma conservado criogénicamente) que comprende (a) combinar esperma a conservar criogénicamente y una composición, referida como FRS, que incluye un captador de radicales libres (tal como un agente reductor o un antioxidante), para producir una combinación (combinación medios crioprotectores-esperma, también referida como la combinación inicial o la combinación a crioconservar) y (b) someter la combinación a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación, produciendo de este modo una combinación conservada criogénicamente que comprende esperma conservado criogénicamente. La combinación inicial (la combinación a crioconservar) se produce antes de la crioconservación y se puede someter a condiciones que dan lugar a la crioconservación de esperma en la combinación inmediatamente después de la producción o dentro de un período de tiempo limitado después de que se produce. La crioconservación puede llevarse a cabo en cualquier momento después de la producción que no afecte adversamente a la viabilidad del esperma, tal como, para esperma del ratón, en cualquier momento dentro de aproximadamente 90 minutos después de que se produce. El esperma resultante es esperma crioconservado que muestra consistentemente mejor potencial de fecundación que el potencial de fecundación del esperma crioconservado obtenido mediante procedimientos y medios disponibles actualmente. La conservación se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente más 4°C a aproximadamente menos 200°C. En realizaciones específicas, la crioconservación se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente menos 80°C y aproximadamente menos 200°C. Los atrapadores de radicales libres descritos en este documento son útiles en la composición de FRS y procedimientos en los que se utiliza FRS.

[0028] En todas las realizaciones descritas en este documento, el esperma crioconservado resultante se puede almacenar indefinidamente a una temperatura apropiada, conocida por los expertos en la técnica (por ejemplo, a temperaturas que van desde aproximadamente menos 80°C a aproximadamente menos 200°C). En todas las realizaciones, los medios crioprotectores pueden comprender componentes adicionales, tales como agua u otro disolvente, agente o agentes antibacterianos, agente o agentes antivirales y/o antibiótico o antibióticos.

[0029] Tal como se usa en el presente documento, "un/una" incluye "al menos uno/a" y "uno/a o más".

[0030] Se describe además un procedimiento para producir descendencia de animales vivos, que pueden ser vertebrados de muchos tipos, incluyendo mamíferos y no mamíferos. Es un procedimiento de producción de descendencia de animales vivos, tales como roedores (por ejemplo, ratón, rata), ganado/bovino (vacas, toros), perros, gatos, cerdos/cochinos, cabras, ovejas, caballos, camellos, conejos, mamíferos domésticos o de compañía, aves (por ejemplo, pollo, pavo, peces domésticos o de compañía (los producidos para el consumo, peces de compañía), otras especies (incluidas las especies en peligro de extinción) y seres humanos. El procedimiento para producir descendencia de animales vivos comprende las etapas descritas anteriormente para conservar criogénicamente esperma y comprende además la descongelar el esperma crioconservado resultante (produciendo de este modo esperma descongelado); introducir esperma descongelado u ovocitos fecundados producidos mediante el uso de esperma descongelado resultante del procedimiento descrito anteriormente en una hembra apropiada (por ejemplo, una hembra pseudopreñada, tal como un ratón pseudopreñado, cuando se utilizan ovocitos fecundados y una hembra receptiva que está en celo, cuando se utiliza el esperma descongelado) y mantener la hembra en las cuales se introdujeron ovocitos o esperma en las condiciones apropiadas para el crecimiento y el desarrollo de ovocitos fecundados en descendencia de animales vivos (apropiado para la producción de descendencia de animales vivos), con lo que se produce la descendencia de animales vivos. En aquellas realizaciones en las que se introduce esperma descongelado en una hembra adecuada, están presentes en un medio apropiado, tal como medio CPM o IFV. Por ejemplo, la combinación de esperma descongelado/medio crioprotector está sin diluir o diluido en un medio IFV apropiado (por ejemplo, Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia; (Quinn et al, 1995)) y se introduce en una hembra receptiva adecuada. El esperma puede ser introducido por inseminación artificial (IA) asistida por cirugía. Por ejemplo, la suspensión de esperma se transfiere por medio de una pipeta de transferencia directamente en un espacio entre el ovario y la bolsa ovárica cerca del infundíbulo de un oviducto. Alternativamente, el esperma se puede insertar en la región de la ampolla a través de la pared del oviducto de una hembra receptiva apropiada, tal como una hembra superovuladas, véase (Sato y Kimura, 2001; Sato et al, 2004). Alternativamente, la combinación de esperma descongelado/medio crioprotector está diluido en un medio IFV apropiado (por ejemplo, Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia; (Quinn et al, 1995)) y se mezcla posteriormente con masas de huevos u ovocitos y se cultivan in vitro en el huevo fecundado humanizada, embriones en etapa de 2 células o etapa de 4 células a 16 células, embriones en etapa de mórula o blastocisto. Posteriormente, los huevos fecundados, embriones en etapa de 2 células o etapa de 4 células a 16 células, embriones en etapa de mórula o blastocisto se introducen en una hembra receptiva apropiada.

[0031] Se describen con más detalle combinaciones de medios de crioprotectores-esperma; esperma conservado criogénicamente; y ovocitos fecundados, embriones de 2 células y cigotos producidos por los procedimientos descritos.

[0032] También se describe descendencia de animales vivos no humanos mediante los procedimientos descritos. En realizaciones específicas, la descendencia de animales vivos son roedores (por ejemplo, ratón, rata), vacas, perros, gatos, cerdos/cochinos, cabras, ovejas, caballos, camellos, conejos, otros mamíferos de compañía, aves (por ejemplo, pollo, pavo, aves de compañía), peces (los producidos para el consumo, peces de compañía), y otras especies (incluyendo especies en peligro de extinción).

Los componentes del crioprotector del medio crioprotector

[0033] Los medios crioprotectores pueden variarse en sus componentes específicos. Por ejemplo, el crioprotector (también referido como agente crioprotector) es típicamente un crioprotector no penetrante (por lo menos uno, uno o más crioprotectores no penetrantes). También se pueden utilizar un crioprotector o crioprotectores penetrantes (al menos uno, uno o más crioprotectores penetrantes). También se puede utilizar una combinación de uno o más crioprotectores no penetrantes y uno o más crioprotectores penetrantes.

[0034] Un crioprotector no penetrante es un soluto (agente/compuesto) que es incapaz de moverse a través de una membrana celular (aquí, la membrana de los espermatozoides) en ningún grado significativo/sustancial. Como componente de la suspensión celular, altera la naturaleza y/o magnitud de los cambios que se producen dentro del esperma y en el medio crioprotector para mejorar o aumentar el número (porcentaje) de células (espermatozoides) que sobreviven a la crioconservación. Los crioprotectores no penetrantes útiles en la presente invención puede ser un azúcar o un no azúcar o una combinación de uno o más azúcares y uno o más no azúcares. En realizaciones específicas, este componente del medio crioprotector es un azúcar o una combinación de dos o más azúcares. Los azúcares incluidos en los medios crioprotectores pueden ser un disacárido o disacáridos (trehalosa, melibiosa, sacarosa, lactosa), un trisacárido o trisacáridos (por ejemplo, rafinosa, melezitosa), un tetrasacárido o tetrasacáridos (por ejemplo estaquiosa), un oligosacárido u oligosacáridos (manotriosa), o un polisacárido o polisacáridos (por ejemplo, dextrano, almidón de hidroxil-etil (HES)) y alcoholes de azúcar de los mismos (por ejemplo, maltitol, lactitol). En realizaciones particulares, el azúcar incluido en los medios crioprotectores es rafinosa o lactosa. Se pueden incluir no azúcares, tales como polivinilpirrolidona (PVP), óxido de polietileno (PEO) o polietilenglicol (PEG), en los medios crioprotectores. Por ejemplo, se puede utilizar PEG de alto peso molecular, tal como PEG de cualquier

peso molecular promedio de PEG400 a PEG20000 Dalton (PEG400 a PEG20000). Alternativamente, un puede utilizarse un crioprotector penetrante. Un crioprotector penetrante es un soluto (agente/compuesto) o un disolvente que puede moverse a través de una membrana celular, tal como la membrana de los espermatozoides. Este componente altera la naturaleza y/o el grado de los cambios que se producen tanto dentro del espermatozoide y en los medios crioprotectores para mejorar o aumentar el porcentaje (número) de células (espermatozoides) que sobreviven a la crioconservación.

[0035] En realizaciones específicas, este componente de los medios crioprotectores es uno o más de los siguientes: un alcohol de azúcar penetrante, tal como glicerol; sulfóxido de dimetilo (DMSO); un alcohol, tal como etilenglicol o propilenglicol, o una combinación de glicerol y propilenglicol. También se puede utilizar una combinación de uno o más crioprotectores no penetrantes y uno o más crioprotectores penetrantes. Debe entenderse que algunos componentes, tales como glicerol, actúan como crioprotector penetrante o no penetrante, dependiendo de las condiciones en las que se utilizan. El glicerol es un alcohol de azúcar que es penetrante de temperatura ambiente a corporal y no penetrante a temperaturas por debajo de 0°C. A temperatura ambiente, el glicerol es un crioprotector penetrante.

Protector de membrana

[0036] El componente protector de la membrana de los medios crioprotectores puede ser cualquiera de una amplia variedad de macromoléculas que actúan como un tampón y diluyente para estabilizar o ayudar en la estabilización de las membranas celulares. El componente protector de la membrana puede ser una (una o más, por lo menos una) proteína, una (una o más, al menos una) sustancia no proteica o una combinación de una proteína o proteínas y una sustancia o sustancias no proteicas. Dicha una o más proteínas pueden estar presentes/derivar de fuentes animales (proteínas animales) y pueden ser, por ejemplo, leche, derivados o componentes de la leche, tales como proteínas de la leche, leche desnatada (tal como leche desnatada líquida o leche desnatada en polvo), una proteína en la leche (por ejemplo, en leche entera, leche desnatada) o un componente de una proteína de la leche; caseína, huevo, yema de huevo, clara de huevo (por ejemplo, huevo fresco, yema de huevo o clara de huevo, tal como huevo fresco, yema de huevo o clara de huevo de gallina), una proteína en el huevo, yema de huevo o clara de huevo; colágeno, elastina, gelatina, atelocolágeno, fibronectina, peptonas, queratina, albúmina o cualquier combinación de las mismas. Alternativamente, dicha una o más proteínas se pueden derivar de fuentes vegetales (proteínas vegetales) y pueden ser, por ejemplo, proteína de soja, proteína de trigo, proteína de maíz, leche de coco, extracto de Aloe vera, extracto de jojoba, o cualquier combinación de las mismas. El protector de la membrana puede ser una combinación de una o más proteínas de origen animal y una o más proteínas vegetales. Dicha una o más proteínas pueden ser una proteína producida de forma recombinante, tal como caseína, colágeno, gelatina, fibronectina, albúmina, lactoalbúmina, lactoglobulina, queratina o cualquier combinación de las mismas. Alternativamente, el protector de la membrana puede ser un lípido (por ejemplo, lípido animal, lípido vegetal, sintetizado químicamente), lípidos sintéticos, tales como fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, 1,1',2,2'-tetraacil-cardiolipina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, lípidos a base de polioxietileno, ácidos grasos de linoleico, araquidónico, linolénico, mirístico, oleico, palmítico o esteárico, colesterol, Pluronic F-68 o se puede utilizar cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, como en los suministros de concentrados de lípidos definidos químicamente por Invitrogen Cat. No.11905-031 o lípido mezcla 1 por Sigma, Cat. No. L0288). Un ejemplo adicional de un protector de membrana es un polímero, alcohol polivinílico (PVA). Se puede utilizar cualquier combinación de los protectores de membrana descritos en este documento o agentes similares en los medios crioprotectores. Por ejemplo, se pueden incluir una o más proteínas, tales como una o más proteínas de origen animal y/o una o más proteínas de origen vegetal y/o una o más proteínas recombinantes en los medios crioprotectores, que también pueden comprender protectores de membrana adicionales, tales como uno o más lípidos (por ejemplo, uno o más lípidos de origen animal y/o uno o más lípidos de origen vegetal y/o uno o más lípidos sintéticos, cualquier mezcla de estos tipos de lípidos) y/o PVA. La concentración del protector de la membrana puede determinarse empíricamente, usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, la concentración del protector de membrana es de aproximadamente 1% peso/volumen a aproximadamente 50% peso/volumen, tal como 3% peso/volumen de la leche desnatada en polvo. Alternativamente, la concentración puede ser de aproximadamente 1% volumen/volumen a aproximadamente 90% volumen/volumen, tal como 23% volumen/volumen para la yema de huevo y 90% para la leche. En todas las realizaciones, la concentración puede ser cualquier concentración dentro de estos intervalos.

Captador de radicales libres

[0037] El componente captador de radicales libres (también referido como agente captador de radicales libres) de los medios crioprotectores utilizado en la presente invención es monotioglicerol. Hay más captadores descritos que son compatibles con la viabilidad del espermatozoide y suficientemente eficaces (activos) que eliminan o inactivan los radicales libres (especies reactivas del oxígeno) en la combinación en un grado tal que aumenta de forma coherente el porcentaje (número) de las células (espermatozoides) que sobreviven a la crioconservación y pueden fecundar ovocitos. El componente captador de radicales libres descrito adicionalmente puede ser cualquier compuesto o molécula, tal como un agente reductor o un antioxidante, que tenga estas características deseadas. Los agentes captadores de radicales libres útiles pueden ser identificados, tal como se describe en el Ejemplo 4 y el Ejemplo 13, en el se evaluó la capacidad del monotioglicerol para actuar como agente reductor utilizando un colorante

fluorescente y citometría de flujo. Los agentes captadores de radicales libres útiles en los medios crioprotectores de la presente invención pueden ser identificados alternativamente mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

[0038] En una realización no de acuerdo con la presente invención, se pueden incluir uno o más captadores de radicales libres (por ejemplo, uno o más agentes reductores y/o uno o más antioxidantes) distintos de monotioglicerol (MTG) en los medios crioprotectores. En realizaciones específicas, el captador de radicales libres puede ser, por ejemplo, uno o más agentes reductores, tales como uno o más de los siguientes: monotioglicerol (MTG), beta-mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), ditioneitol, tiorredoxina (TRX), ditioneitol, 2-mercaptoetilamina, dimetil tiourea; ácido nordihidroguaiarético (NDGA), 2,3-dimercapto-1-propanol o hidroquinona. Alternativamente, el captador de radicales libres puede ser uno o más antioxidantes, tales como uno o más de los siguientes: un aminoácido o derivado del mismo (por ejemplo, glutatión reducido (GSH), cisteína, homocisteína, N-acetil cisteína (NAC), metionina, N-2-mercaptopropionil glicina, alanina, glutatión), bilirrubina, melatonina, manitol, ácido lipoico, 10,11-dihidroxiaporfina (DHA), hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado, ácido dihidrolipoico, tetrahidropapaverolina (THP), ácido 2-tiobarbitúrico, o taurina e ácido dimercaptosuccínico inositol. Además, el captador de radicales libres puede ser una vitamina (tal como vitamina E (tocoferol o un derivado del mismo, tal como formas solubles en agua de la vitamina E, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina A, carotenoides, (astaxantina), complejo de vitamina B (incluyendo inositol) o coenzima Q); alopurinol, sulfóxido de dimetilo, deferoxamina, una enzima (tal como catalasa, glutatión peroxidasa o superóxido dismutasa), un esteroide (tal como 21-aminoesteroides, metilprednisolona), o glutatión.

[0039] En los medios crioprotectores de la presente invención, el captador de radicales libres es monotioglicerol. En esta realización, el captador de radicales libres está presente típicamente en los medios crioprotectores a un nivel de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 50 mM (50000 μM). Se puede utilizar cualquier nivel entre aproximadamente 50 μM a aproximadamente 50 mM (50000 μM) de monotioglicerol. En una realización adicional, el captador de radicales libres es glutatión reducido (GSH). En esta realización, el captador de radicales libres está presente típicamente en los medios a un nivel de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 50 mM. Se puede utilizar cualquier nivel entre aproximadamente 50 μM a aproximadamente 50 mM (50000 μM) de GSH. La concentración de otros captadores de radicales libres puede determinarse empíricamente y variará dependiendo del agente particular utilizado.

[0040] En una realización específica de los medios crioprotectores, el crioprotector es un azúcar (por ejemplo, rafinosa o lactosa), o un alcohol de azúcar (por ejemplo, glicerol), o un alcohol (por ejemplo, propilenglicol), o combinación de dos o más de los anteriores (por ejemplo, lactosa y/o rafinosa y propilenglicol o lactosa y/o rafinosa y glicerol); el protector de membrana es una macromolécula, tal como una leche o proteína de la leche (tal como proteína de leche desnatada) o leche desnatada o yema de huevo; y el captador de radicales libres es un agente reductor, tal como monotioglicerol, o un antioxidante, tal como GSH.

[0041] En una realización alternativa de los medios crioprotectores (CP-FRS), el crioprotector es un azúcar (por ejemplo, rafinosa, o lactosa), o un alcohol de azúcar (por ejemplo, glicerol), o un alcohol (por ejemplo, propilenglicol), o una combinación de dos o más de los anteriores (por ejemplo, lactosa y/o rafinosa y propilenglicol o lactosa y/o rafinosa y glicerol) y el captador de radicales libres es un agente reductor, tal como monotioglicerol o ditioneitol, o un antioxidante, tal como GSH.

[0042] En otras realizaciones específicas, dicho (al menos uno; uno o más) azúcar es rafinosa o lactosa; dicho (al menos uno; uno o más) protector de membrana es una macromolécula, tal como una leche; y dicho (al menos uno; uno o más) agente reductor es monotioglicerol (MTG). En otras realizaciones específicas, dicho (al menos uno) azúcar es rafinosa; dicha (al menos una) macromolécula es una proteína de la leche; y dicho (al menos uno) antioxidante es GSH. Alternativamente, dicho (al menos uno; uno o más) protector de membrana es leche desnatada.

[0043] En realizaciones más específicas, el crioprotector es un (al menos uno, uno o más) azúcar, tal como lactosa o un alcohol de azúcar, tal como glicerol o un alcohol, tal como propilenglicol; dicho (al menos uno; uno o más) protector de membrana es yema de huevo (por ejemplo, yema de huevo fresco, tal como yema de huevo fresco de gallina) o leche desnatada; y dicho (al menos uno; uno o más) captador de radicales libres es monotioglicerol (MTG) o glutatión reducido o ditioneitol (DTT). En otras realizaciones específicas, dicho (al menos uno; uno o más) azúcar es rafinosa; dicha (al menos una; una o más) macromolécula es leche desnatada o una proteína de la leche; y dicho (al menos uno; uno o más) captador de radicales libres es GSH, MTG o TDT.

[0044] En una realización específica, el procedimiento de la presente invención es un procedimiento para conservar criogénicamente esperma, que comprende combinar esperma con medios crioprotectores, que comprende al menos un azúcar; al menos un protector de membrana (por ejemplo, una macromolécula, tal como una proteína o un polímero); y al menos un captador de radicales libres, tal como un agente reductor o un antioxidante. Dicho al menos un azúcar puede ser cualquiera de los azúcares descritos en este documento; el protector de membrana es un polímero, tal como alcohol polivinílico o Pluronic F-68; y dicho al menos un agente captador de radicales libres puede ser cualquier agente reductor o cualquier antioxidante descrito en el presente documento o una combinación

de uno o más agentes reductores y uno o más antioxidantes.

[0045] Las cantidades y concentraciones relativas de cada uno de estos componentes de los medios crioprotectores (crioprotector, protector de membrana, captador de radicales libres), así como las cantidades y concentraciones relativas de otros componentes del medio (por ejemplo, agua) se pueden determinar empíricamente, usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, para la producción de una variedad de medios. Véanse los ejemplos.

Procedimientos para conservar esperma

[0046] Los medios y procedimientos de crioconservación de la presente invención se pueden usar para la conservación de esperma de una amplia variedad de mamíferos y en realizaciones específicas, se utilizan para la crioconservación de esperma de roedores, tal como esperma de ratón o rata; esperma bovino o esperma humano. Como se describe en mayor detalle a continuación, los medios y procedimientos se pueden utilizar con cualquier cepa/subcepa o especie de ratón. En casos específicos, la composición de los medios de crioconservación se puede ajustar en cuanto a sus componentes y/o sus respectivas concentraciones, con el fin de mejorar la eficacia de los medios en la protección del tipo particular de esperma (por ejemplo, ajustarse para adaptarse a la cepa particular de esperma de ratón) de la crioconservación. Los ajustes pueden hacerse empíricamente usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la cepa de ratón puede ser de especies endogámicas (por ejemplo, ratones C57BL/6; BALB/c; FVB/N; 129S3/SvIm) o exogámicas.

[0047] Los medios crioprotectores y procedimientos de esta invención son particularmente útiles para la crioconservación de esperma de ratón, tal como esperma de cepas endogámicas de ratones, en particular las cepas de ratones C57BL, tales como C57BL/6, y, por tanto, para la producción de ratones vivos de todos los tipos y cepas, tal como la descendencia de animales C57BL vivos, tal como descendencia de animales C57BL/6 vivos. El procedimiento se puede utilizar para producir descendencia de animales vivos de todos los ratones con base C57BL, tal como cepas C57BL/6 y particularmente descendencia de C57BL/6 (por ejemplo, transgénicos modificados genéticamente, knockouts, así como, pero no limitados a, descendencia de animales 129 vivos, descendencia de animales FVB vivos y descendencia de animales BALB/c vivos. Véanse, por ejemplo, las Tablas 3A y 3B).

[0048] El esperma que se procesa mediante el procedimiento y utilizando los medios crioprotectores de la presente invención puede ser no eyaculado, tal como el obtenido tal como se describe en el presente documento, o esperma eyaculado. La combinación de medios crioprotectores-esperma se puede colocar en viales, criotubos, ampollas de vidrio, minitubos o tubos para la crioconservación y el posterior almacenamiento. La cantidad o concentración de esperma a utilizar puede determinarse empíricamente usando procedimientos conocidos, teniendo en cuenta factores, tales como el tipo de los espermatozoides y el tipo, tamaño y forma del recipiente que se utiliza. En los casos en los que el esperma de ratón se crioconserva o usa, se utilizan generalmente de 0,3x a 3x de esperma por 10 microlitros de CPM o CP-FRS. La concentración 1x se define de tal manera que el esperma de un macho se recoge en 1 ml de CPM o CP-FRS. En el caso de ratones C57BL/6, esta es una concentración en el intervalo de $31,5 \pm 2,8 \times 10^6$ espermatozoides/ml. Para otras cepas y especies, la concentración óptima puede ser diferente de la de los espermatozoides de C57BL/6 y se puede determinar empíricamente utilizando técnicas conocidas para el experto en la técnica.

Kits

[0049] En otro aspecto, la presente invención proporciona cualquiera de las composiciones descritas en este documento en los kits, incluyendo opcionalmente instrucciones para el uso de las composiciones (por ejemplo, para la conservación de esperma y/u otras células). Es decir, el kit puede incluir una descripción del uso de una composición en cualquier procedimiento descrito en este documento. Un "kit", tal como se usa en el presente documento, por lo general define un envase, ensamblaje, o recipiente (tal como un recipiente aislado) que incluye uno o más de los componentes de la invención, y/u otros componentes asociados con la invención, por ejemplo, como se ha descrito previamente. Cada uno de los componentes del kit pueden proporcionarse en forma líquida (por ejemplo, en solución), o en forma sólida (por ejemplo, un polvo secado, congelado, etc.).

[0050] En algunos casos, el kit incluye uno o más componentes, que pueden estar en el mismo o en dos o más recipientes, y/o en cualquier combinación de los mismos. El recipiente es capaz de contener un líquido, y los ejemplos no limitantes incluyen botellas, viales, frascos, tubos, matraces, vasos de precipitados, o similares. En algunos casos, el recipiente es a prueba de derrames (cuando está cerrado, el líquido no puede salir del recipiente, independientemente de la orientación del recipiente).

[0051] En una realización, un kit puede comprender dos o más de: un protector de membrana, un captador de radicales libres y un agente crioprotector, que puede estar en el mismo recipiente, o dividido entre dos o más recipientes. Como ejemplo no limitativo específico, un primer recipiente puede contener al menos dos de: el protector de membrana, el captador de radicales libres y el agente crioprotector, mientras que un segundo recipiente puede contener un componente que no está presente en el primer recipiente. En algunos casos, los componentes del kit pueden estar contenidos dentro de un recipiente adecuado, tal como una caja de cartón, una caja de poliestireno

expandido, etc. El kit puede transportarse a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C.), enfriado (por ejemplo, a aproximadamente 4°C), y/o uno cualquiera o más de los componentes pueden transportarse congelado (por ejemplo, entre -20°C y -80°C, aproximadamente a -150°C, etc.) o en nitrógeno líquido (aproximadamente -196°C.). En algunos casos, uno o más de los componentes se congelan y/o transportan en hielo seco (aproximadamente -80°C.).

[0052] Con respecto a soluciones congeladas, si está presente más de un componente (por ejemplo, como se describe anteriormente), los componentes pueden estar congelados juntos en un solo líquido común (por ejemplo, dentro de un recipiente común), o como dos o más líquidos separados (por ejemplo, dentro de recipientes separados).

[0053] En ciertos casos, algunos de los componentes pueden ser procesables (por ejemplo, a una forma activa), por ejemplo, mediante la adición de un disolvente adecuado o de otras especies, que pueden o no proporcionarse con el kit. Por ejemplo, el componente puede calentarse o se puede añadir un líquido al componente (por ejemplo, si el componente se congela, se liofiliza, transporta en una forma concentrada, etc.).

[0054] El kit para su uso en la crioconservación de esperma comprende al menos un crioprotector; monotioglicerol como captador de radicales libres; y al menos un protector de membrana. En una realización específica, el captador de radicales libres fue identificado mediante un procedimiento descrito en este documento. Se describe además un kit que comprende al menos un crioprotector y al menos un captador de radicales libres.

[0055] En algunos casos, el kit incluirá un recipiente criogénico que es un recipiente adecuado para contener los materiales a temperaturas criogénicas, por ejemplo, nitrógeno líquido. Los de experiencia ordinaria en la técnica serán conscientes de recipientes criogénicos adecuados, por ejemplo, un frasco de Dewar (por ejemplo, formado de acero inoxidable y/o aluminio, etc.), un expedidor de vapor, un recipiente de acero inoxidable, un recipiente de poliestireno extruido, o similares. Típicamente, las temperaturas criogénicas incluyen temperaturas por debajo de aproximadamente -150°C, por debajo de aproximadamente -170°C, o por debajo de aproximadamente -190°C. Por ejemplo, el nitrógeno líquido tiene un punto de ebullición de aproximadamente -196°C.

[0056] El kit también puede contener un recipiente para contener esperma y/u otras células. En algunos casos, este recipiente es capaz de contener el líquido que contiene el esperma y/o una solución congelada o líquido que contiene el esperma. Por ejemplo, el recipiente puede estar construido de modo que pueda resistir temperaturas criogénicas sin rotura o fractura. En algunas realizaciones, el recipiente puede colocarse dentro de un recipiente criogénico, tal como se ha descrito anteriormente, (por ejemplo, utilizando un flotador (por ejemplo, que puede flotar en nitrógeno líquido u otro líquido criogénico dentro del recipiente criogénico)). Ejemplos no limitantes de recipientes para el esperma y/u otras células adecuadas incluyen tubos celulares, ampollas de vidrio, criotubos, crioviales, etc. El recipiente puede estar premarcado en ciertos casos.

[0057] Los ejemplos de otras composiciones o componentes asociados con la invención incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, sales, tampones, agentes quelantes, conservantes, agentes de secado, antimicrobianos, agujas, jeringas, materiales de envase, tubos, botellas, frascos, vasos de precipitados, y similares, por ejemplo, para el uso, modificación, montaje, almacenamiento, envasado, preparación, mezcla, dilución, y/o conservación de los componentes para un uso particular. En realizaciones en las que se utilizan formas líquidas de cualquiera de los componentes, la forma líquida puede ser concentrada o lista para usar.

[0058] Un kit de la invención generalmente incluirá instrucciones o instrucciones a un sitio web u otra fuente en cualquier forma que se proporcione para usar el kit en relación con los componentes y/o procedimientos de la invención. Por ejemplo, las instrucciones pueden incluir instrucciones para el uso, modificación, mezcla, dilución, conservación, montaje, almacenamiento, envase y/o preparación de los componentes y/u otros componentes asociados con el kit. En algunos casos, las instrucciones también pueden incluir instrucciones para la liberación de los componentes, por ejemplo, para el transporte a temperatura ambiente, temperaturas bajo cero, temperaturas criogénicas, etc. Las instrucciones pueden proporcionarse en cualquier forma que sea útil para el usuario del kit, tal como oral o escrita (por ejemplo, telefónica), digital, óptica, visual (por ejemplo, cinta de vídeo, DVD, etc.) y/o comunicaciones electrónicas (incluyendo Internet o comunicaciones basadas en web), proporcionada de cualquier manera.

[0059] Como se usa en el presente documento, las instrucciones pueden incluir protocolos, direcciones, guías, advertencias, etiquetas, notas, y/o "preguntas frecuentes" (FAQs), y típicamente implican instrucciones escritas o asociadas con la invención y/o con el envasado de la invención. Las instrucciones también pueden incluir comunicaciones de instrucciones en cualquier forma (por ejemplo, oral, electrónica, digital, óptica, visual, etc.), proporcionada en cualquier forma (por ejemplo, dentro o separado de un kit) de tal manera que un usuario reconocerá claramente que las instrucciones se utilizan con el kit.

[0060] Como ejemplo, un kit tal como se describe en el presente documento puede transportarse a un usuario, típicamente con instrucciones de uso. Por ejemplo, las instrucciones pueden instruir al usuario a añadir esperma al protector de membrana y el captador de radicales libres, y almacenar la combinación resultante y/o devolver el kit y

el esperma al remitente. Como otro ejemplo, las instrucciones pueden instruir al usuario a combinar esperma, protector de membrana, captador de radicales libres, y un agente crioprotector, y crioconservar la combinación resultante (por ejemplo, tal como se describe anteriormente). La combinación crioconservada podría entonces almacenarse, devolverse al remitente para el almacenamiento y la recuperación posterior, o similares.

Identificación de los captadores de radicales

[0061] Se describe además un procedimiento de identificación de un captador de radicales libres adecuado para su uso en la crioconservación de esperma, que comprende evaluar al menos una de las siguientes actividades de un captador de radicales libres candidato: (a) la capacidad (potencia) para reducir especies reactivas del oxígeno en esperma; (b) el efecto de la motilidad del esperma; y (c) efecto en la fecundación in vitro, en el que si el captador de radicales libres candidato produce un efecto beneficioso en al menos uno de (a), (c) (b) o, el captador de radicales libre candidato es un captador de radicales libres. Por ejemplo, si existe una reducción en las especies reactivas de oxígeno en el esperma cuando se ponen en contacto, combinan o incuban los espermatozoides con un captador de radicales libres candidato, el captador de radicales libres candidato es un captador de radicales libres adecuado para su uso en la crioconservación de esperma. Si la motilidad del esperma se mejora o al menos se mantiene a sustancialmente el mismo nivel que antes de la crioconservación, cuando se ponen en contacto, combinan o incuban los espermatozoides con un captador de radicales libres candidato, el captador de radicales libres candidato es un captador de radicales libres adecuado para uso en la crioconservación de esperma. Si la fecundación in vitro se mejora o al menos se mantiene a sustancialmente el mismo nivel que antes de la crioconservación, cuando se ponen en contacto, combinan o incuban los espermatozoides con un captador de radicales libres candidato, el captador de radicales libres candidato es un captador de radicales libres adecuado para uso en la crioconservación de esperma. En una realización, si un captador de radicales libres a identificar es un captador de radicales libres para su uso en la crioconservación de esperma de ratón, se evalúan la actividad (a) y/o la actividad (c). En una realización, si un captador de radicales libres a identificar es un captador de radicales libres para su uso en la crioconservación de esperma bovino, se evalúan la actividad (a) y/o la actividad (b). El procedimiento puede llevarse a cabo usando una variedad de estrategias para detectar el efecto, si lo hay, de un captador de radicales libres candidato, tal como un procedimiento en el que se utiliza un colorante. En una realización, el procedimiento comprende incubar (a) esperma cargado con un indicador permeante de células (colorante) para las especies reactivas de oxígeno que es no fluorescente a menos que se produzca la oxidación dentro del esperma y (b) un captador de radicales libres candidato, produciendo de este modo una combinación incubada y evaluar el nivel de especies reactivas del oxígeno dentro del esperma en la combinación incubada. Si se reduce el nivel de especies reactivas del oxígeno en el esperma (por ejemplo, en relación con el nivel de especies reactivas del oxígeno dentro del esperma en ausencia del captador de radicales libres candidato), el captador de radicales libres candidato es un captador de radicales libres adecuados para su uso en la crioconservación de esperma. Un captador de radicales libres identificado por la evaluación de una o dos de las tres actividades descritas anteriormente, se puede evaluar adicionalmente para su utilidad como captador de radicales libres mediante la evaluación de actividades adicionales. Por ejemplo, si se evalúa la capacidad (potencia) para reducir especies reactivas de oxígeno en el esperma, se pueden evaluar el efecto del captador de radicales libres en la motilidad del esperma, su efecto de la fecundación in vitro; o ambos, según proceda, para proporcionar una indicación adicional de la idoneidad del captador de radicales libres para su uso en la crioconservación de esperma.

EJEMPLOS

[0062] Los siguientes ejemplos describen el uso de los medios y procedimientos de la presente invención. No pretenden ser limitantes de ninguna manera.

Ejemplo 1

Crioconservación de esperma de ratón

[0063] Los informes históricos han detallado que las tasas de recuperación de recién nacidos vivos cuando se utiliza esperma de C57BL/6 crioconservado varía típicamente desde 0% a menos del 10% (Glenister y Thornton, 2000). Nagakata informa de una tasa de fecundación del 26% (Nakagata y Takeshima, 1993). La aplicación de procedimientos muy complejos, como el procedimiento de dos etapas, para seleccionar los espermatozoides de mayor calidad en la descongelación por Bath et al 2003 mejoran las tasas de fecundación, pero no son adecuados para un banco eficiente (incluyendo recuperación) de un gran número de cepas de C57BL/6 a través de esperma crioconservado.

[0064] El Laboratorio Jackson ha estado trabajando en el desarrollo de una estrategia viable, económica para guardar cepas endogámicas y especialmente cepas C57BL/6 cepas. En el presente documento se describe un medio crioprotector modificado (CPM) que proporciona una estrategia económica a este problema.

TABLA 2

Comparativa de estrategias de crioconservación: Caracterización y capacidad de fecundación de esperma de

C57BL/6J

CPM	% de acrosomas intactos después de descongelar	% de membranas intactas después de descongelar	% de 2 células
Procedimiento tradicional	16,1 ± 0,06	22,5 ± 0,08	7,03 ± 0,35 ^b
Procedimiento CPM	16,8 ± 0,13	26,4 ± 0,22	192, ± 0,26 ^a

[0065] Se utilizaron hembras CByB6F1 para la donación de ovocitos. Se realizaron comparaciones de porcentajes usando una transformación arcoseno; los porcentajes dentro de una columna que tienen un superíndice único (a y b) son diferentes con HSD Tukey-Kramer ($p < 0,05$); (Véase la Tabla 2). La Tabla 2 muestra que no se observaron diferencias medibles en la viabilidad del esperma del ratón o en el porcentaje de espermatozoides vivos que tienen acrosomas intactos, pero que hay una diferencia significativa en la tasa de fecundación del esperma del ratón (% de 2 células) con un 19% utilizando el CPM, frente al 7% usando el procedimiento tradicional.

[0066] Los solicitantes han demostrado que las tasas de fecundación se mejoran ampliamente y de manera consistente cuando se llevan a cabo los medios y procedimientos descritos en este documento. Los epidídimos y conductos deferentes se extraen del macho de C57BL/6J y se colocan en los medios crioprotectores descritos en este documento. Se extraen y se colocan en una gota de recogida de 1 ml incubada de medio crioprotector (CPM), que comprende, por ejemplo, rafinosa [18% p/v], leche desnatada [3% p/v] y monoglicérol (MTG) a concentraciones de 159 μ M a 636 μ M. Se realizan incisiones en los tejidos, lo que permite a los espermatozoides nadar hacia fuera en el CPM; esto se permite durante al menos 5, pero durante menos de 20 min. Los tejidos residuales se retiran a continuación de la gota de recogida. Se cargan diez microlitros de la muestra de esperma en como máximo cien pajuelas francesas de 250 μ l (IMV; Maple Grove, Minnesota). Se sellan tubos de doscientos cincuenta microlitros, que contienen una columna de 5,5 cm de CPM, una columna de 2,5 cm de aire, una columna de 0,6 cm de muestra de esperma seguido de una columna de aire, con un sellador de calor instantáneo. Los tubos se cargan en casetes y se exponen a vapor de nitrógeno líquido durante al menos 10 min antes de sumergirse en el nitrógeno líquido. Esto enfría esencialmente el esperma a 37°C/min.

[0067] Posteriormente al almacenamiento en nitrógeno líquido, se descongelan 3 muestras de cada tratamiento en un baño de agua a 37°C durante 30 s, y a continuación, se coloca directamente cada alícuota de 10 μ l en su propia gota de fecundación in vitro (FIV) de 500 μ l de Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia). Después de una hora de incubación, se añaden 4 grupos de ovocitos de cumulus intacto de hembras de C57BL/6J superovuladas a las gotas de fecundación in vitro. La FIV se llevó a cabo utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, tales como mediante los procedimientos descritos por Nakagata. (Nakagata, 2000a; Nakagata, 2000b). El esperma y los ovocitos se incuban juntos durante 4 horas antes de que los presuntos cigotos se extraigan de la gota de FIV y se coloquen en una gota de cultivo para la incubación durante la noche.

[0068] Aproximadamente 18 horas más tarde, se determina el porcentaje de ovocitos que desarrollan embriones de 2 células (# embriones de 2 células/# ovocitos totales). Para el análisis estadístico, los porcentajes se transforman con arcoseno y se evalúan los promedios de al menos 3 gotas de FIV por tratamiento con un test T. Se ilustra una diferencia entre los tratamientos con un asterisco ($p < 0,05$). Para la presentación, los promedios y los errores estándar se convirtieron de nuevo en porcentajes.

[0069] Todas las concentraciones de MTG muestran una tasa de fecundación mejorada, con respecto a los resultados obtenidos utilizando procedimientos actualmente disponibles. Una concentración MTG de 477 μ M proporcionó los mejores resultados. Véase la figura 1 y la Tabla 3 y la Tabla 4A.

TABLA 3

Tasa de fecundación utilizando ratones C57BL/6J y un procedimiento CPM o tradicional

	Tasa de fecundación	Embriones de 2 células transferidos	Nacidos vivos
CPM	68,4%	225	80
Procedimiento tradicional	6,5%	45	7

[0070] El día siguiente, se pueden transferir los embriones de 2 células a receptoras pseudopreñadas o crioconservadas para su uso posterior.

[0071] Las metodologías anteriores han proporcionado tasas de fecundación inferiores al 10% (Songsasen y Leibo, 1997; Szczygiel et al, 2002; Sztejn et al, 2001; Thornton et al, 1999) utilizando esperma de C57BL/6J crioconservados en un procedimiento de FIV estándar sin ninguna manipulación de los ovocitos y sin preselección de los espermatozoides, sin utilizar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Sólo hay un informe en el que se afirma haber alcanzado una tasa de fecundación del 26% para C57BL/6J (Nakagata y Takeshima,

1993). Utilizando la estrategia descrita en el presente documento, que incluye el uso de un captador de radicales libres, se han obtenido tasas de fecundación mayores del 75%. Estos procedimientos también han mejorado de manera amplia y consistente las tasas de fecundación observadas para otras cepas de ratón también. Por ejemplo, utilizando los procedimientos anteriores no era raro encontrar tasas de fecundación para BALB/cJ, FVB/NJ y 129P3/J inferiores al 10%, 30% y 5%, respectivamente.

[0072] Los ratones referidos en el presente documento como 129P3/J se refirieron en las solicitudes de prioridad como ratones 129P/J. Esto es sólo un cambio de nomenclatura. El procedimiento descrito en este documento ha dado como resultado tasas de fecundación observadas del 58%, 98% y 48%, respectivamente. Véanse las Tablas 4A y 4B.

TABLA 4A

Evaluación de las tasas de fertilidad							
	Cepa						
	129X1/SvJ	129S1/SvImJ	BALB/cByJ	BALB/cJ	C3H/HeJ	FVB/NJ	C57BL/6J
Tratamiento	Tasa promedio de fecundación						
CPM + MTG	51,2% (81/158)	18,5% (80/425)	69,1% (231/177)	58,4% (153/290)	99,0% (301/307)	98,6% (203/209)	68,4% (326/488)
Procedimiento tradicional	21,7 % (93/428)	0,0% (0/36)	7,0% (39/521)	10,3% (144/1299)	55,3% (150/327)	27,4 % (203/607)	6,5% (227/1581)

TABLA 4B

Evaluación de las tasas de fertilidad en diferentes cepas de ratón

cepa de ratón	CPM (+MTG)	Procedimiento tradicional
129P3/J	48,20%	12% (Songsasen y Leibo, 1997)
A/J	92,67%	no hay datos
CAST/Eij	2,38%	0%
DBA/2J	87,85%	45%
FVB/NJ	98,6%	27,4%
NOD/LTJ	75,21%	no hay datos
SJL/J	46,56%	no hay datos

Ejemplo 2

Crioconservación de esperma de ratón con CPM que contiene GSH

[0073] Los solicitantes han demostrado que las tasas de fecundación mejoran ampliamente y de manera consistente cuando se llevan a cabo los medios y procedimientos descritos en el presente documento. Los epidídimos y conductos deferentes se extraen del macho de C57BL/6J y se colocan en los medios crioprotectores descritos en este documento. Se extraen y se colocan en una gota de recogida de 1 ml incubada de medio crioprotector (CPM), compuesta de rafinosa [18% p/v], leche desnatada [3% p/v] y glutatión reducido [GSH; de 500 μ M a 50 mM]. Se realizan incisiones en los tejidos, lo que permite a los espermatozoides nadar hacia fuera en el CPM; esto se permite durante al menos 5, pero durante menos de, 20 min. Los tejidos residuales se retiran a continuación de la gota de recogida. Se cargan diez microlitros de la muestra de esperma en como máximo cien pajuelas francesas de 250 μ l (IMV; Maple Grove, Minn.). Se sellan tubos de doscientos cincuenta microlitros, que contienen una columna de 5,5 cm de CPM, una columna de 2,5 cm de aire, una columna de 0,6 cm de muestra de esperma seguido de una columna de aire, con un sellador de calor instantáneo. Esto enfría esencialmente el esperma a 37°C/min. Después de almacenarse en nitrógeno líquido, se descongelan 3 muestras de cada tratamiento en un baño de agua a 37°C durante 30 s, y a continuación, se coloca directamente cada alícuota de 10 μ l en su propia gota de fecundación in vitro (FIV) de 500 μ l de Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia). Después de una hora de incubación, se añaden 4 grupos de ovocitos intactos cumulus de hembras de C57BL/6J superovuladas a las gotas de fecundación in vitro. (Nakagata, 2000a; Nakagata, 2000b).

[0074] El esperma y los ovocitos se incuban juntos durante 4 horas antes de que los presuntos cigotos se extraigan de la gota de FIV y se coloquen en una gota de cultivo para la incubación durante la noche.

[0075] Aproximadamente 18 horas más tarde, se determina la tasa de fecundación (# embriones de 2 células/# ovocitos totales). Para el análisis estadístico, los porcentajes se transforman con arcoseno y se comparan los promedios de las 3 gotas de FIV con el control dsin GSH utilizando procedimientos de Dunnett. Los resultados se presentan en la figura 2. Una diferencia significativa del control se ilustra con un asterisco. Para la presentación, los promedios y los errores estándar se convierten de nuevo en porcentajes.

[0076] La prueba de diferentes concentraciones de GSH revela que las concentraciones de 500 μ M a 5 mM aumentan las tasas de fecundación en comparación con CPM sin un agente reductor. El uso de 500 μ M de GSH muestra una mejora en las tasas de fecundación similar a la obtenida con 477 μ M de MTG en condiciones similares.

Ejemplo 3

Las tasas de fecundación con espermatozoides criopreservados de diversas cepas de ratón difieren en respuesta a la criopreservación con MTG.

[0077] Se congelan alícuotas de 10 μ l de espermatozoides de una variedad de cepas de ratón en ausencia (CPM-MTG) o presencia de monoglicerol (CPM). Se utilizan un total de al menos 6 muestras de espermatozoides por tratamiento dentro de una cepa. Estos representaban al menos 3 muestras de cada uno de al menos 2 grupos de 2 machos cuyo espermatozoides se agrupa en el momento de la recogida y a continuación se divide en dos tratamientos. Después de la descongelación, las muestras se colocan directamente en su propia gota de fecundación in vitro (FIV) de 500 μ l de Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia; (Quinn et al, 1995)). Después de una hora de incubación, se añaden 4 grupos de ovocitos de cumulus intacto de cepas isogénicas al medio de incubación. Después de una co-incubación de 4 horas, se lavan los presuntos cigotos y se cultivan durante la noche. Aproximadamente 18 horas después, se determina la tasa de fecundación (# embriones de 2 células/# ovocitos totales). Véase la Tabla 5.

TABLA 5

Tasas de fecundación determinadas en presencia (CPM) y ausencia de MTG (CPM-MTG)			
Tratamiento	Cepa		
	129S1/SvImJ	BALB/cJ	C57BL/6J
CPM-MTG	31,1%	46,2%	49,0%
CPM	48,1%	58,4%	68,4%

Ejemplo 4

[0078] Evaluación de la reducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por MTG. Descripción del captador de radicales libres mediante el procedimiento de colorante/espermatozoides.

[0079] Se carga el espermatozoides criopreservados en presencia y ausencia del captador de radicales libres, el agente reductor de monoglicerol (MTG), con el colorante fluorescente verde CM-H2DCFDA para medir especies reactivas de oxígeno intracelulares. Los espermatozoides se estimularon con diferentes niveles de peróxido de terc-butilhidrógeno para inducir daño oxidativo y se mide la fluorescencia verde usando citometría de flujo. Como se muestra en la figura 3, el MTG reduce las ROS en el espermatozoides criopreservados de ambos ratones C57BL/6J (B6) y BALB/cByJ (BALB/CBY).

Ejemplo 5

Criopreservación y recuperación de espermatozoides de cepas de ratón modificadas genéticamente

[0080] Se han llevado a cabo las mismas estrategias en espermatozoides obtenidos de ratones C57BL/6J machos que tenían modificaciones genéticas y contribuciones genéticas variables procedentes de la cepa 129, así como otras cepas, tales como FVB/N.

[0081] Se congelan alícuotas de 10 μ l de espermatozoides de un número de cepas de ratones modificadas genéticamente en CPM con 477 μ M de monoglicerol como captador de radicales libres (CPM) de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Para un ratón transgénico que llevaba una construcción de expresión YAC, se recogió el espermatozoides de la cepa Tg (YAC72)2511Hay en la base FVB/NJ. Para los ratones que llevaban modificaciones debido a genes de reconocimiento (knockout), se recogió el espermatozoides de knockout PLA1, knockout de glucógeno sintasa quinasa 3 β y knockout de miembro transportador 12 de orgánico/anión catión de la familia 22 de portadores de soluto de cepas de ratón. La base de la cepa significa aquí una contribución del 50% o más de esta cepa a la base genética de la cepa de ratón. Se determinó la tasa de fecundación (# embriones de 2 células/# ovocitos totales) y se calculó el porcentaje promedio. Los valores dentro de los paréntesis ilustran el # total de dos células/el número total de ovocitos a lo largo de la FIV. Tal como se muestra en la Tabla 6, se han obtenido altas tasas de fecundación en todos los casos. Esto demuestra que un criobanco de germoplasma de ratón macho para la reconstitución de cepas es una opción viable.

TABLA 6

Capacidad de fecundación de los espermatozoides de ratones modificados genéticamente

No. de referencia JR	Base de la cepa	Modificación genética	% en la etapa de 2 células (# 2 células/# ovocitos)
3640	FVB/NJ	transgén Tg (YAC72) 2511Hay	81 (105/130)
3238	BALB/cJ	knockout de C2ta (transactivador de clase II)	76 (112/148)
2329	FVB/NJ	knockout de PLAU (activador de plasminógeno, uroquinasa)	86 (151/176)
5817	C57BL/6J	knockout de glucógeno sintasa quinasa 3β	65 (72/111)
5839	C57BL/6J	knockout de miembro transportador 12 de orgánico/anión catión de la familia 22 de portadores de soluto	68 (53/78)

Ejemplo 6

5 Determinación de la concentración y la motilidad del esperma

10 **[0082]** Para determinar la concentración, la motilidad y la motilidad progresiva de esperma "recién recogido", el esperma normalmente se diluye en 1:20, en solución salina tamponada con fosfato o Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia; (Quinn et al., 1995)). Para evaluar el esperma descongelado, se incuba esperma en un medio FIV durante una hora, a una dilución de 1:50 en la gota de FIV. Se carga entonces en un analizador de semen informatizado Hamilton Thorn IVOS (Hamilton Thorn, Beverly, Mass.). Para la medición, los parámetros de calibración se establecen de la siguiente manera:

Tipo de aplicación:	2
Fotogramas adquiridos:	30
Velocidad de fotogramas:	60 Hz
Contraste mínimo:	30
Tamaño celular mínimo:	4 píxels
Contraste estático mínimo:	15
Rectitud (STR), umbral:	50%
Corte VAP bajo:	10,0 μm/s
Corte VAP medio:	50,0 μm/s
Corte VSL bajo:	0,0 μm/s
Tamaño de cabeza, no móvil:	13 píxels
Intensidad de cabeza, no móvil:	75
Tamaño de cabeza estática:	0,57 a 2,91
Intensidad de cabeza estática:	0,14 a 1,84
Elongación estática:	0 a 87
Movilidad lenta de las células:	SÍ
Aumentos:	0,82
Fuente de vídeo:	Cámara
Frecuencia de vídeo:	60
Campo brillante:	No
Brillo para LED:	2663
Brillo para Ident:	3000
Temperatura, fijada:	37°C
Tipo de célula:	Usuario
Establecimiento de la profundidad de célula:	100,0 μm
Modo de selección de campo:	SELECT
Indent Activo:	NO
Modo Ident:	B
Tiempo de integración:	1 fotograma
<u>Óptica</u>	
Ganancia de vídeo:	Media
Brillo de vídeo:	2300
Contraste de vídeo:	40
Nivel de sincronización de vídeo:	FW Sync_Level_100
Sincronización vertical de vídeo:	75
<u>Tipo # 2</u>	
Puntos en la pista:	16 a 100
Velocidad de reproducción (VCL):	146,0 a 1000,0

Linealidad: 0,0 a 20,0

Ejemplo 7

Evaluación de la capacidad de fecundación del espermatozoides después de la criopreservación

[0083] Para asegurar que la mejora en la capacidad de fecundación del espermatozoides de ratones C57BL/6J después de la criopreservación no es sólo el desarrollo de embriones de dos células, los solicitantes también transfirieron los embriones a receptoras pseudopreñadas. De los 225 embriones transferidos, de un total de 3 grupos de 3 machos, 80 se desarrollaron hasta el nacimiento (35,6%). Esto es aproximadamente una mejora de tres a cinco veces sobre datos previos obtenidos en los laboratorios del solicitante y muchos otros laboratorios de FIV con espermatozoides de C57BL/6J criopreservados (Figura 4).

Ejemplo 8

Criopreservación de espermatozoides de ratones modificados genéticamente con CPM que contiene MTG y recuperación de nacidos vivos

[0084] Se congelan alícuotas de 10 µl de espermatozoides de una variedad de cepas de ratón indicadas en la Tabla 7 en el CPM con 477 µM de monotiolesterol como ROS (CPM). Se utilizan un total de al menos 6 muestras de espermatozoides por tratamiento dentro de una cepa. Estos representaban al menos 3 muestras de cada uno de al menos 2 grupos de 2 machos cuyo espermatozoides se agrupa en el momento de la recogida y a continuación se divide en los dos tratamientos. Después de descongelar las muestras se colocan directamente en sus propios 500 µl en la gota de fecundación in vitro (FIV) de Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia; (Quinn et al, 1995)). Después de una hora de incubación, se añadieron 4 grupos de ovocitos de cumulus intacto de cepas isogénicas al medio de incubación. Después de una co-incubación de 4 horas, los presuntos cigotos se lavaron y cultivaron durante la noche. Aproximadamente 18 horas después, se determinó la tasa de fecundación (% 2 células: #embriones de 2 células/# ovocitos totales, véase la Tabla 7). Se determinó el porcentaje promedio. Para cada línea, se implantaron aproximadamente 30 embriones de 2 células en hembras receptoras. Después de aproximadamente 21 días, se determinó el número de ratones nacidos vivos, que se muestra como el % de nacidos vivos en la Tabla 7.

[0085] En resumen, los procedimientos descritos en este documento, en el que se usaron medios crioprotectores, tal como se describen anteriormente, dan resultados buenos y consistentes para espermatozoides de ratón modificado genéticamente, comparables a las cepas endogámicas parentales. Con las cepas parentales, se han obtenido las siguientes tasas de fecundación: 129S1/SvImJ 18%; C57BL/6J 68%; Balb/cJ 58%, para BALB/cByJ 69%, y FVB/NJ 98%.

TABLA 7

Donante de espermatozoides	Donante de ovocito	# Ovocitos	# embriones de 2 células	% embriones de 2 células	% nacidos vivos
C57BL/6-Tg(Csflr-EGFP-NGFR/FKBP1A/TNFRSF6)2Bck/J	C57BL/6J	219	59	26,94	43,3
B6(Cg)-Ncf1<mIj>/J B6.Cg-Mapt<tm1 (EGFP) Klt>	C57BL/6J	218	84	38,53	43,3
Tg(MAPT)8cPdav/J	C57BL/6J	224	54	24,11	30
B6.129S-Shh <tm2 (cre/ESR1)Cjt>/J	C57BL/6J	182	142	78,02	26,7
B6; C3H-Tg(Scgblal-Scnnlb)6608Bouc/J	B6C3FeF1	209	180	86,12	66,7
CByJ.A-Ttc7 <fsn>/J	BALB/cByJ	221	176	79,64	46,7
B6.129S2(C)-Stat6 <tmlGru>/J	C57BL/6J	223	223	100	43,3
C3.B6-Tg(Fabp1-Ccnd1)4Rdb/J	C3H/HeJ	138	107	77,54	26,7
B6.129S1-Csf2rb1 <tm1Cgb>/J	C57BL/6J	253	37	14,62	35,7
B6.HRS(BKS)-Cpe <fat>/J	C57BL/6J	237	116	48,95	13,3
B6.D2N-Ahr <d>/J	C57BL/6J	143	67	46,85	40
B6.Cg-F2rl1 <tm1Mslb>/J	C57BL/6J	186	95	51,08	50
B6.129P2-P2rx7	C57BL/6J	242	79	32,64	50

<tm1Gab>/J						
FVB-Tg(Sod1-G86R)	FVB/NJ	134	40	29,85	48	
M1Jwg/J						
C.Cg-Fv4<r>/Hmj	BALB/cJ	138	21	15,22	28,6	
C.Cg-Gatal<tm6Sho>/J	BALB/cJ	70	61	87,14	20	
STOCK Dicer1 <tmlBdh>/J	C57BL/6J	217	128	58,99	46,7	
B6.Cg-Gusb<mps>/BrkJ	C57BL/6J	289	60	20,76	33,3	
B6.129S4-Cxcl10	C57BL/6J	257	64	24,90	50	
<tm1Adl>/J						
B6.Cg-Msr1<tm1Csk>/J	C57BL/6J	161	35	21,74	53,3	
B6; 129S7-Ephb4	C57BL/6J	285	100	35,09	36,7	
<tm1And>/J						
B6.Cg-Tg(F2RL1)	C57BL/6J	235	113	48,09	33,3	
1Ms1b/J						
B6.129S2-Thbs1	C57BL/6J	204	62	30,39	56,7	
<tm1Hyn>/J						
B6.Cg-Tg(PDGFB-APPSwInd) 20Lms/2J	C57BL/6J	232	55	23,71	36,7	
B6.C3-Gusb<mps-2J>/BrkJ	C57BL/6J	188	57	30,32	30	
B6.C-H2<bml>/ByBir-Gusb<mps>/SopJ	B6.C-H2<BML>/ByJ	94	22	23,40	47,6	
B6.Cg-Tg(ACTB-EGFP) 1Osb/LeySopJ	C57BL/6J	299	116	38,80	36,7	
B6.129S6-Ppt1tm1Hof/J	C57BL/6J	227	121	53,30	30	
C3H/HeOuJ-Gusb <mps-2J>/BrkJ	C3H/HeOuJ	211	134	63,51	36,7	
C57BL/6J-Kit <W-41J>/SopJ	C57BL/6J	304	109	35,86	53,3	
129-Gt(ROSA) 26Sor	129/SvImJ	281	85	30,25	30	
<tmlLuo>/J						
CBy.Cg-Gpi1<a-m1Ehs>/BrkJ	BALB/cJ	141	25	17,73	58,3	
B6.Cg-Gpi1<a-m1Ehs>/BrkJ	C57BL/6J	195	49	25,13	20	

Ejemplo 9

Crioconservación de espermatozoos de rata

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- [0086]** Los epidídimos y los conductos deferentes se recogieron de una rata LEW/SsNHsd de 33 semanas de vida (Harlan, Indianapolis, Indiana). Se realizaron incisiones en el tejido y se permitió que el espermatozoos nadara hacia fuera, en 2 ml de una solución que contenía lactosa al 8% [p/v] (Sigma Aldrich; St. Louis, Mo.) y yema de huevo al 23% [v/v] de huevos frescos en agua destilada (Invitrogen; Carlsbad, Calif.) durante 10 min. A continuación, la suspensión de espermatozoos se dividió colocando la mitad en la solución de lactosa/yema de huevo y suspendiendo la otra mitad en una solución de lactosa/yema de huevo que contenía MTG 954 micromolar en tubos cónicos de 15 ml. Esto dio lugar a una concentración final de MTG de 477 μ M. Los tubos cónicos de 15 ml que contenían las muestras de espermatozoos se colocaron en un vaso de precipitados que contenía 150 ml de agua a 15°C durante 10 min. Después del período de enfriamiento inicial, el vaso de precipitados que contenía los tubos de agua y cónicos se transfirió a un refrigerador a 4°C donde se enfriaron las muestras durante una hora y 15 min. Después de enfriar a 4°C, el espermatozoos se diluyó en seis composiciones de medios diferentes, tal como se describe en la Tabla 8. El CPM para el espermatozoos de rata tenía la siguiente composición: el crioprotector era lactosa sola o lactosa y glicerol o propilenglicol; el protector de membrana era yema de huevo fresco de gallina y MTG como el captador de radicales libres.
- [0087]** Se cargó espermatozoos en pajuelas francesas de 250 μ l (IMV; Maple Grove, Minnesota; Cat # AAA201), que a continuación se sellaron con un sellador de calor instantáneo (modelo AIE-305HD; American International Electric; Whittier, Calif.) y 5 de ellas se cargaron en casetes (Zanders Medical Supplies; Vero Beach, Florida). Los casetes se colocaron en una balsa situada dentro de una caja de poliestireno expandido que contenía nitrógeno líquido y las muestras se expusieron a vapor LN₂ durante al menos 10 min antes de sumergirse en la fase líquida. El aparato empleado esencialmente permitió que los espermatozoos se enfriaran a 37°C/min desde una temperatura de -10°C a una temperatura de -60°C. Las muestras de espermatozoos se almacenaron en nitrógeno líquido durante al menos 20 horas. Las muestras se descongelaron en un baño de agua a 37°C y empujaron la pajuela en una placa de petri estándar de 35x10 mm BD Falcon (Fisher Scientific, EE.UU.). El espermatozoos se diluyó 1:50 en Cooks Mouse Vitro Fert (Cook's; Spencer, Ind.) y la motilidad se evaluó contando al menos 5 campos diferentes utilizando un monitor de video conectado a un microscopio usando 40 aumentos. Se utilizaron los siguientes valores: 0 para ausencia de motilidad, + a ++++ para la proporción de células móviles siendo ++++ la más alta. En todos los casos probados, la

adición de MTG produjo un aumento de la motilidad, dando el mejor resultado el CPM compuesto por lactosa, glicerol, yema de huevo y MTG.

TABLA 8

5

Análisis de la rata de esperma de motilidad después de la crioconservación en un número de diferentes medios			
Composición de CPM			
Crioprotector	Protector de membrana	Captador de radicales libres	Respuesta de la motilidad después de la descongelación
lactosa al 8%	yema de huevo al 23%		+
lactosa al 8%	yema de huevo al 23%	MTG 477 μ M	+
lactosa al 8%, glicerol 0,9 M	yema de huevo al 23%		++
lactosa al 8%, glicerol 0,9 M	yema de huevo al 23%	MTG 477 μ M	++++
lactosa al 8%, propilenglicol 0,9 M	yema de huevo al 23%		0
lactosa al 8%, propilenglicol 0,9 M	yema de huevo al 23%	MTG 477 μ M	+++

Ejemplo 10

Crioconservación de esperma bovino

10

[0088] Se recogió semen a través de una vagina artificial de 6 toros Holstein diferentes durante 3 días diferentes. Los toros se seleccionaron de tal manera que tres producen esperma con buena calidad de congelación consistente y tres producen esperma que responde a la crioconservación con peor consistencia. Se añadieron antibióticos al semen puro y se determinaron el volumen inicial y la concentración usando un cilindro graduado y espectrofotometría. De cada recogida, se extendieron 5 alícuotas diferentes de 500 μ l de semen con 1,5 ml de extensor de yema de huevo Triladyl (Minitube; Verona, Wis.) que contenía glicerol. Posteriormente, se añadieron 2 ml del mismo extensor que no contenía MTG, 200, 1.000, 2.000 o 10.000 μ M de MTG al semen extendido para dar las concentraciones finales de MTG de 0, 100, 500, 1000 o 5000 μ M. Después de la extensión, el semen se transfirió a una habitación fría y se enfrió a 4°C durante -1,5 horas. Se suministró extensor que contenía la concentración 1x apropiada de MTG a cada alícuota con lo que la concentración de esperma final era de 80×10^6 /ml. Este semen más extendido se cargó en pajuelas francesas 1/4CC utilizando materiales de carga automatizados (MRS4; IMV Technologies, Maple Grove, Minnesota) y se almacenó a 4°C durante 3 horas. Tras el período de tiempo de equilibrio, las pajuelas se congelaron en un congelador de velocidad controlada de la siguiente manera: 4°C/min a -12°C; 40°C/min a -100°C; 20°C/min a -140°C. Las muestras se transfirieron a copas y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta que el examen.

25

[0089] Para el examen, se descongelaron 6 pajuelas por tratamiento por recogida en un baño de agua a 37°C durante al menos 60 s. Para cada tratamiento dentro de una recogida, se crearon dos conjuntos de semen y se analizaron mediante la combinación de los contenidos de tres pajuelas. Para la motilidad, las muestras de esperma se diluyeron 1:3 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se tiñeron con 100 μ g/ml de colorante fluorescente de ADN Hoechst 33342 antes de que se examinaran usando el sistema Hamilton Thorne Integrated Visual Optics Sytem (IVOS). El porcentaje de espermatozoides móviles se determinó en 4 campos diferentes dentro cada uno de 2 cámaras separadas. Para la viabilidad se diluyeron las muestras de esperma 1:100 en PBS y se tiñeron con SYBR 14 (00 nM) y yoduro de propidio (12 μ M). Se contaron aproximadamente 10.000 células usando el citómetro de flujo Partec Flomax (Ft Collins, Colorado).

35

Resultados:

40

[0090] Motilidad. No se detectaron diferencias en la motilidad entre los tratamientos. Esta ausencia de discrepancia se mantuvo incluso después de 3 h de incubación. Del mismo modo, cuando los toros se agruparon en base a sus características de congelabilidad de esperma, no se detectaron diferencias a las 0 o 3 horas. Estos resultados muestran que el CPM que consiste en glicerol, yema de huevo y MTG a diversas concentraciones no tiene efectos nocivos sobre la motilidad general después de la descongelación de esperma de toro.

45

[0091] Viabilidad. Tal como se muestra en la figura 5C, la viabilidad global no fue influenciada negativamente por el CPM que consistía en glicerol, yema de huevo y MTG a diversas concentraciones. Cuando los toros individuales se analizaron individualmente (Figura 5C), los efectos positivos parecen evidentes.

50

[0092] La adición de MTG a los medios crioconservantes da lugar a un aumento de la viabilidad con un ligero efecto para los 3 toros y aproximadamente un incremento del 8% para los otros 3 toros.

Ejemplo 11

Crioconservación del semen humano

[0093] Se recoge una muestra de semen de cada uno de los varones sanos, normales y fértiles. Los hombres fértiles se definen como individuos de 19-30 años de edad que han engendrado un niño de forma natural en los últimos 6 meses. Además, las muestras se consideran normales si cumplen con los parámetros establecidos por criterios de la OMS para el recuento, la motilidad y morfología de espermatozoides. La muestra de semen se recoge después de un mínimo de 48-72 horas de abstinencia sexual, pero no más de siete días. El semen se obtiene por masturbación y eyaculación en un recipiente de plástico estéril, de boca ancha, a prueba de toxicidad. El sujeto es instruido que se debe tener cuidado para incluir toda la muestra en el recipiente. Tras la recepción del eyaculado por el laboratorio, cada muestra de semen se introduce en un libro de registro de análisis de semen. A la muestra de semen se le asigna un número de código de acceso consecutivo, que se registra junto con el nombre del paciente y la fecha de recogida. La muestra del paciente es identificada por el número de código de acceso durante todo el procedimiento de congelación; todos los tubos, portamuestras, etc. están etiquetadas con este número. Aunque la muestra se licue, los medios crioprotectores están recién preparados: TYB (Irvine Scientific, cat # 90128: 20% de yema de huevo - de bandadas ponedoras SPF (sin virus) certificado por USDA, inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos; 12% v/v de glicerol; 10 µg/ml de sulfato de gentamicina) y 477 µM de MTG o TYB solo. Para el control se utiliza medio TYB sin MTG.

[0094] La muestra de semen se mezcla suavemente con los medios crioprotectores recién preparados a una proporción de 1:1 y se transfieren volúmenes de 0,25 ml de la mezcla de muestra/crioprotector a cada uno de los crioviales marcados (1 ml de Nunc). Los crioviales se colocan en un bastidor metálico y se suspenden en vapores de LN₂ del tanque de almacenamiento durante 12 minutos. Después de 12 minutos, los crioviales se colocan en la caña de aluminio enfriada marcada y la caña se inserta en la funda de cartón enfriada marcada y se sumerge en un recipiente en el tanque de almacenamiento. El semen crioconservado se almacenará durante al menos 1 hora en el nitrógeno líquido. Se descongelará un único vial colocando el criovial en un vaso de precipitados que contenía agua caliente a 37°C durante 10 minutos. A continuación, la muestra se mezcla suavemente con una pipeta estéril. El semen se analiza para la morfología (por ejemplo acrosoma), la motilidad, la progresión, la viabilidad y el recuento inmediatamente después de la descongelación. Se pueden realizar la prueba de penetración de ovocitos de hámster libre de zona o el ensayo de capacitación clorotetraciclina para determinar la calidad del semen.

Ejemplo 12

Preparación y almacenamiento de medios crioprotectores

[0095] Se colocaron aproximadamente 80 ml de agua destilada embotellada (Invitrogen, cat # 15230-238) en un vaso de precipitados y se calentó durante 40 segundos en un horno microondas a alta potencia. Se tuvo cuidado de no llegar a ebullición. El vaso de precipitados se colocó en una placa de agitación calentada y se añadieron 18 g de rafinosa (Sigma cat # R7630). La solución se calentó y se agitó hasta que se aclaró. Posteriormente, se añadieron 3 g de leche desnatada (BD Diagnostics Cat # 232100) y la solución se agitó hasta que la leche desnatada en polvo se disolvió. La solución se transfirió a un matraz volumétrico y se llevó a 100 ml con agua destilada estéril (Invitrogen, cat # 15230-238). Una vez más, la solución se mezcló bien y se dividió en dos tubos de centrifuga de 50 ml. Para aclarar la solución, se centrifugó a 13,000xg durante 15 minutos a temperatura ambiente (22°C) y a continuación se filtró a través de un filtro de celulosa de 0,22 µ. Esto dio lugar a una solución de 18% de rafinosa/3% de leche desnatada que tenía una osmolaridad final de 488 mOsm. Un tercio de esta solución se suplementó con 477 µM de monioglicerol (MTG; Sigma cat # M6145) y se congeló a -80°C en un congelador Elite. RTM. Serie Revco (Asheville, Carolina del Norte). Los otros dos tercios se congelaron a -80°C sin ningún tipo de complemento.

[0096] Después de 8 semanas de almacenamiento a -80°C, las soluciones de leche desnatada y rafinosa se descongelaron en un baño de agua a 37°C hasta que no se observó más precipitado (~ 1 h). El primer medio crioprotector consistió en 18% de rafinosa, 3% de leche desnatada 3%, 477 µM de MTG congelado durante 8 semanas (MTG CONGELADO). El segundo medio crioprotector consistió en 18% de rafinosa y 3% de leche desnatada congelada durante 8 semanas complementada en el momento de la recogida de esperma con 477 µM de MTG fresco (MTG FRESCO). El tercer medio crioprotector consistió en 18% de rafinosa y el 3% de leche desnatada que había sido congelado a -80°C durante 8 semanas (SIN MTG).

[0097] Se sacrificaron dieciocho machos C57BL/6J y se obtuvieron sus conductos deferentes y epidídimos y se aisló el esperma tal como se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 1). Se crearon nueve grupos diferentes, de dos machos cada uno, y les se asignó a cada grupo que tenía su esperma recogido en uno de tres medios crioprotectores diferentes. Esto dio lugar a 3 grupos de machos recogidos para cada tratamiento. Se cargaron cuatro alícuotas, de 10 µl cada una, en diez pajuelas francesas de 1/4 CC (IMV; Maple Grove, Minn.; Cat # AAA201). Éstas se sellaron con un sellador de calor instantánea (modelo AIE-305HD; American International Electric; Whittier, California), y 5 de ellos cargaron en un cassette (Zanders Medical Supplies; Vero Beach, Fla.). Los casetes se

colocaron en una balsa situada dentro de una caja de poliestireno expandido que contenía nitrógeno líquido y las muestras se expusieron a vapor de LN₂ durante al menos 10 min antes de sumergirse en la fase líquida. Esto permitió que el esperma se enfriara a 37°C/min desde una temperatura de -10°C a una temperatura de -60°C. Las muestras de esperma se almacenaron en nitrógeno líquido durante aproximadamente 3 meses.

[0098] Para determinar si el almacenamiento de los medios crioprotectores a -80°C alteraba la actividad del esperma de ratón C57BL/6J, se realizaron fecundaciones in vitro (FIV) como se describe anteriormente (véase el Ejemplo 1, véanse también las publicaciones por Nakagata, 2000a; Nakagata, 2000b, Szein et al 2000; Byers et al 2006). Brevemente el esperma y los ovocitos, ambos de ratones C57BL/6J, se incubaron juntos durante 4 horas en un incubador de mesa a 37°C. Después de 4 horas de coincubación, los presuntos cigotos se lavaron a través de dos gotas de 150 µl de medio de FIV (MVF; Cook's; Spencer, Ind.) y se cultivaron durante la noche. Aproximadamente 18 horas más tarde, se calculó el porcentaje de ovocitos fecundados dividiendo el número de embriones de dos células por la suma de dos células y que normalmente aparecen presuntos ovocitos de una célula.

[0099] La figura 6 demuestra claramente que el almacenamiento de los medios crioprotectores con MTG durante 2 meses a -80°C se realiza igualmente en comparación con los medios crioprotectores con MTG recién añadido. La columna MTG CONGELADO muestra la tasa de fecundación cuando el esperma de C57BL/6J se crioconservó con los medios completos almacenados a -80°C. La columna de MTG FRESCO muestra la tasa de fecundación cuando el esperma de C57BL/6J se crioconservó con los medios almacenados a -80°C, pero añadiendo MTG fresco. La columna de SIN MTG muestra la tasa de fecundación cuando el esperma de C57BL/6J se crioconservó con los medios almacenados a -80°C, pero sin contener MTG fresco. Las diferencias en el porcentaje de ovocitos que desarrollan 2 células entre los tratamientos se determinaron usando análisis de varianza en porcentajes transformados con arcoseno y las comparaciones para todos los pares de medios utilizando análisis estadístico Tukey-Kramer HSD (JMP; SAS Institute, Cary, NC). Estos medios con letras diferentes son significativamente diferentes (p < 0,05). Para la presentación, se muestran los promedios y desviaciones estándar de los porcentajes. No se puede observar diferencia significativa entre las dos preparaciones de medio MTG CONGELADO y MTG FRESCO.

Ejemplo 13

Identificación de un captador de radicales libres adecuados

[0100] Se puede identificar un captador de radicales libres adecuado (útil para la crioconservación de esperma) mediante pruebas de una o más de las siguientes actividades (a) capacidad para reducir especies reactivas del oxígeno (ROS), (b) efecto sobre la motilidad del esperma, y (c) efecto en la fecundación in vitro (FIV). En aquellos casos en los que se identifica un captador de radicales libres adecuado para su uso con el esperma del ratón, se evalúan/llevan a cabo (a) y (c). Para esperma bovino, se llevan a cabo (a) y (b). En cada caso, se puede llevar a cabo la tercera actividad ((b) para el ratón y (c) para bovino). En realizaciones específicas, se analizará uno de (b) o (c) anterior, además del (a) anterior.

[0101] Por ejemplo, la capacidad de reducir ROS puede analizarse mediante un procedimiento de colorante/esperma tal como se describe en el Ejemplo 4 y también véanse las publicaciones por Nelid et al 2006 y Guthrie y Welch 2006. Se puede utilizar esperma fresco o crioconservado en este ensayo. Por ejemplo, el esperma recogido de los conductos deferentes y el epidídimo de dos ratones C57BL/6J en 1 ml de una solución que contenía 3% de leche desnatada (p/v; BD Diagnostics BD; cat # 232100) y 18% de rafinosa (p/v; Sigma; cat # R7630). Una fracción del esperma recogido se diluyó 1:1 en la misma solución de rafinosa y leche desnatada, mientras que otra fracción se diluyó 1:1 utilizando la solución de rafinosa y leche desnatada suplementada con monoglicérol 954 mM (MTG; Sigma Aldrich; Cat # M6145). Se utilizó otro conjunto de C57BL/6J machos para recoger esperma y se diluyó en la solución de rafinosa y leche desnatada con glutatión 1 mM (GSH; Sigma Aldrich; cat # G6013) o ditiotreitól 2 mM (DTT; Sigma Aldrich; cat # 646563). El esperma se crioconservó tal como se describe en el Ejemplo 1 y se almacenó en nitrógeno líquido durante al menos 24 horas.

[0102] Para determinar si MTG, GSH o TDT pueden actuar como un captador de radicales libres, el esperma se descongeló y se cargó con el colorante verde fluorescente diacetato de 5-(y-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (CM-H2DCFDA; Invitrogen C6827). Este colorante es un indicador permeante de células para especies reactivas de oxígeno que es no fluorescente hasta la eliminación de los grupos acetato por esterasas intracelulares y la oxidación se produce dentro de la célula. La emisión de la fluorescencia se correlaciona con la generación de ROS como resultado de la oxidación de DCFH. Para cargar el esperma, se descongelaron al menos 150 µl de esperma y se diluyeron 1:1 en un medio de incubación de esperma descrito por Bath et al. ((Bath 2003); NaCl 123 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄·7H₂O 0,2 mM; NaHCO₃ 10 mM; HEPES 21 mM; piruvato de sodio 0,33 mM; glucosa 4,6 mM; 100 UI/ml de penicilina G; 1,33 mg/ml de BSA). El colorante liofilizado se resuspendió en dimetilsulfóxido a una concentración de 432,5 µM y después se añadió a las células, de manera que la concentración de colorante final fue de 40 µM. Se dejó que el esperma captado el colorante durante 30 min y a continuación se alicuotaron 50 µl de las células en tubos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (tubos de poliestireno de 12x75 mm, Falcon # 2052 o 2054 o tubos de polipropileno, USA Plastics PN 1450-

0000). Se añadieron quinientos microlitros de medio de incubación de esperma que contenía una dilución de 50 veces del agente reductor potencial utilizado para crioconservar el esperma. Este nivel de agente reductor se seleccionó para reflejar la misma dilución de 50 veces observada durante una rutina de fecundación in vitro. A continuación, el esperma se centrifugó durante 5 min a 300 xg, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 µl de medio de incubación de esperma que contenía la dilución de 50 veces del agente reductor potencial apropiado. El esperma se estimuló a continuación a diversas concentraciones de hidroperóxido de terc-butilo (por ejemplo, Sigma Aldrich; cat # B2633) para inducir el estrés oxidativo. Las muestras estresadas se incubaron durante 1 hora, se llevaron a 300 µl en medio de incubación de esperma suplementado con el agente reductor bajo análisis y a continuación se tiñeron con 5 µg/ml de yoduro de propidio (por ejemplo, Invitrogen, cat # P-3566) y 5 µg/ml de LDS-751 (Invitrogen, cat # L7595) para diferenciar las células nucleadas vivas y las muertas. Las muestras se cargaron en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ) o FACSCalibur (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ) y se midió la fluorescencia verde en a aproximadamente 5000 espermatozoides viables. Las figuras 7A y 7B muestran que todos los aditivos ensayados en este experimento redujeron el nivel de especies reactivas de oxígeno dentro de las células de esperma de ratón crioconservado.

[0103] Las Figuras 7A y 7B muestran resultados de los siguientes: se cargó esperma de C57BL/6 crioconservado en presencia y ausencia de tres potenciales captadores de radicales libres (monotioglicerol (MTG); ditiotretol (DTT); glutatión (GSH)) con el colorante fluorescente verde CM-H2DCFDA para medir especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS). El esperma se estimuló a diferentes niveles de hidroperóxido de terc-butilo para inducir el estrés oxidativo y se midió la fluorescencia verde usando citometría de flujo (A) FACSCalibur y (B) FACScan. Tal como se muestra, los potenciales agentes reductores limitaron el nivel de ROS en el esperma de ratón crioconservado. El eje y muestra que la fluorescencia relativa es la más alta cuando no está presente el captador de radicales libres (línea continua) y el eje x muestra la concentración de hidroperóxido de terc-butilo.

[0104] Si el compuesto es capaz de reducir ROS a la concentración ensayada, a continuación, se prueba su efecto sobre la motilidad del esperma y la fecundación. Aunque el ensayo de motilidad de esperma es una herramienta de cribado rápida útil en el caso de ratón, no se requiere este ensayo para ratón y se puede realizar sólo el ensayo de FIV en el caso de ratón. Para otras especies, por ejemplo, bovino, el ensayo de la motilidad del esperma junto con el ensayo de fluorescencia es suficiente. El ensayo de la motilidad del esperma se puede realizar con esperma fresco o crioconservado. Por ejemplo, la motilidad se puede determinar tal como se describe en el Ejemplo 6 (Determinación de la concentración y la motilidad de esperma), utilizando un instrumento IVOS. Brevemente, se diluyó esperma de C57BL/6 1:50 en Mouse Vitro Fert precalentado y gasificado (Cook's; Spencer, Indiana) bajo aceite mineral ligero. Las muestras se incubaron durante una hora a 37°C, en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de nitrógeno en un incubador de mesa K-MINC-1000 (Cook's; Spencer, Ind). Después de la incubación, el esperma se introdujo en tubos de 0,1 x 2,0 mm de D.I. (VibroCom Inc. Mt Lks. NJ) utilizando la acción capilar y se analizaron 3 campos seleccionados manualmente por muestra para la motilidad usando el sistema de óptica visual integrada (IVOS) Hamilton Thorn (Beverly, Mass.) para el análisis de semen informatizado. Los solicitantes han demostrado que el esperma congelado en CPM que no contiene captador de radicales libres, MTG 0,477 mM, DTT 0,1 mM, DTT 1 mM, DTT 5 mM, DTT 20 mM, GSH 0,5 mM, GSH 1 mM, GSH 5 o GSH 50 mM puede ser evaluado para la motilidad y se requiere que una motilidad de al menos el 5% para lograr la fecundación en FIV. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y el promedio se indica en la Tabla 9.

TABLA 9

Motilidad de esperma de C57BL/6 después de diferentes tratamientos de CPM		
Captador de radicales libres	Motilidad promedio después de la descongelación	Se ajusta a FIV
ninguno	10-29%	sí
DTT 0,1 mM	24,6%	sí
DTT 1 mM	34%	sí
DTT 5 mM	17,6%	sí
DTT 20 mM	1,6%	no
GSH 0,5 mM	32%	sí
GSH 1 mM	25,3%	sí
GSH 5 mM	41,67%	sí
GSH 50 mM	0,6%	no
MTG 477 mM	16%	si

[0105] Si el compuesto ha pasado la prueba de esperma/colorante y el ensayo de motilidad, a continuación, se prueba su efecto sobre la FIV. La FIV se llevó a cabo, tal como se describe en el Ejemplo 1, con esperma crioconservado de C57BL/6 en medios que contienen captador de radicales libres, DTT, GSH o MTG.

TABLA 10

Fertilidad de esperma de C57BL/6 después de diferentes tratamientos de CPM

Captador de radicales libres	Tasa de fertilidad	(embriones de 2 células de ovocitos totales)
ninguno	31,2%	(56 de 179)
DTT 0,1 mM	19,2%	(33 de 169)
DTT 1 mM	2%	(2 de 94)
DTT 5 mM	0,9%	(2 de 212)
DTT 20 mM	6,4%	(11 de 147)
GSH 0,5 mM	59,7%	(38 de 229)
GSH 1 mM	49,5%	(99 de 202)
GSH 5 mM	39,9%	(74 de 195)
GSH 50 mM	0,0%	(0 de 249)
MTG 477 mM	75,2%	(111 de 149)

[0106] Estos datos muestran claramente que el esperma con una motilidad por debajo del 5% está en peligro y tiene menos capacidad de fecundar ovocitos (DTT 20 mM y GSH 50 mM). Además, estos datos muestran que, además de los criterios de espermatozoides móviles, la tasa de fecundación da lugar a un ensayo fiable para determinar la efectividad del compuesto y su dosis.

Ejemplo 14

Crioconservación de espermatozoides de ratón con CPM que contiene un crioprotector y un captador de radicales libres (CP-FRS)

[0107] Se extraen los epidídimos y los conductos deferentes de tres ratones C57BL/6J machos y se colocan en los medios crioprotectores descritos en este documento. Los espermatozoides se extraen y se colocan en una gota de recogida de 1 ml incubada de medio crioprotector (CPM), que comprende, por ejemplo, rafinosa [18% p/v] y monotioglicerol [MTG: 100 µM a 1 mM] o rafinosa [18% p/v] y glutatión reducido [GSH; 500 µM a 50 mM]. En este ejemplo, los solicitantes utilizaron 18% p/v de rafinosa y 477 µM de monotioglicerol. Se dejó nadar el esperma hacia fuera en el CPM; esto se dejó durante al menos 5 minutos, pero durante menos de 20 min. Los tejidos residuales se retiraron a continuación de la gota de recogida. Se cargaron diez microlitros de la muestra de esperma en hasta cien pajuelas francesas de 250 µl (IMV; Maple Grove, Minnesota). Se cargaron cuatro alícuotas de 10 µl del esperma recogido en las pajuelas, que se sellaron con un sellador de calor instantáneo. Las pajuelas se colocaron en casetes y se expusieron a vapor de nitrógeno líquido durante 10 minutos. Esto esencialmente enfrió el esperma a 37°C/min. Después almacenarse en nitrógeno líquido durante al menos 24 horas, se descongelaron 6 muestras de cada tratamiento en un baño de agua de 37°C durante 30 s y a continuación se colocó cada alícuota de 10 µl directamente en su propia gota de 500 µl de fecundación in vitro (FIV) de Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia: Quinn et al., 1995). Después de una hora de incubación, se añadieron 4 grupos de ovocitos de cumulus intacto de hembras de C57BL/6J superovuladas a la gota de fecundación in vitro (véase el Ejemplo 1 y también Nakagata, 2000a; Nakagata, 2000b, Sztein et al 2000; Byers et al 2006).

[0108] Brevemente, el esperma y los ovocitos, ambos de ratones C57BL/6J, se incubaron juntos durante 4 horas en un incubador de sobremesa a 37°C. Después de 4 horas de co-incubación, los presuntos cigotos se lavaron a través de dos gotas de 150 µl de medio FIV (MVF; Cook; Spencer, Ind.) y a continuación se cultivaron durante la noche. Aproximadamente 18 horas más tarde, se calculó el porcentaje de ovocitos fecundados dividiendo el número de embriones de dos células por la suma de dos células y que normalmente aparecen presuntos ovocitos de una célula.

TABLA 1

Animales para los que puede utilizarse la presente invención		
Categoría	Ejemplos pero no limitados a	Notas:
LÍNEAS DE RATÓN ENDOGÁMICAS	C3H CBA DBA FVB NOD BALB/c 129 C57BL	
Ratones C57BL Todas las otras cepas de ratones endogámicos, incluyendo cepas endogámicas recombinantes	C57BL/6J, C57BL/6NTac, C57BL/6NCrI, C57BL/10 129S1/SvImJ, 129T2/SvEmsJ, 129X1/SvJ, 129P3/J, A/J, AKR/J, BALB/cBy, BALB/cByJ, BALB/c	www.informatics.jax.org/external/festingmouse/docs/C57BL.shtml definición: Los ratones endogámicos son genéticamente homogéneos y homocigotos en todos los loci. El

BALB/cJ, C3H/HeJ, C3H/HeOuJ,
 C3HeB/FeJ, C57BL/10J, C58,
 CBA/CaHN-Btkxid/J, CBA/J,
 DBA/1J, DBA/1LacJ, DBA/2J,
 FVB/NJ, MRL/MpJ, NOD/LtJ, SJL/J,
 SWR/J, NOR/LtJ, NZB/BINJ,
 NZW/LacJ, RBF/DnJ,
 129S6/SvEvTac, AJTAC,
 BALB/cAnNTac, BALB/cJBomTac,
 BALB/cABomTac, C57BL/6NTac,
 C57BL/6JBomTac,
 C57BL/10SgAiTac, C3H/HeNTac,
 CBA/JBomTac, DBA/1JBomTac,
 DBA/2NTac, DBA/2JBomTac,
 FVB/NTac, NOD/MrkTac,
 NZM/AegTac, SJL/JcrNTac,
 BALB/cAnNCrIBR, C3H/HeNCrIBR,
 C57BL/6NCrIBR, DBA/2NCrIBR,
 FVB/NCrIBR, CB-17/lcrCrIBR,
 129/SvPaslcoCrIBR,
 SJL/JorllcoCrIBR, A/JolaHsd,
 BALB/cAnNHsd, C3H/HeNHsd,
 C57BL/10ScNHsd, C57BL/6NHsd,
 CBA/JCrHsd, DBA/2NHsd ,
 FVB/NHsd, SAMP1/KaHsd,
 SAMP6/TaHsd, SAMP8/TaHsd,
 SAMP10/TaHsd, SJL/JCrHsd,
 AKR/OlaHsd,
 BiozziABH/RijHsd,
 C57BL/6JolaHsd, FVB/NhanHsd,
 MRL/MpOlaHsd, NZB/OlaHsd,
 NZW/OlaHsd, SWR/OlaHsd,
 129P2/OlaHsd, y 129S2/SvHsd.
 B6.129P2-Apoetm1Unc/J
 NOD.CB17-Prkdcscid/J
 129S1/SvlmJ
 129X1/SvJ
 B10.A-H2a H2-T18a/SgSnJ
 B10.D2-Hc0 H2d H2-T18c/oSnJ
 B10.D2-HC1 H2d H2-T18c/nSnJ
 B10.RIII-H2r H2-T18b/(71NS)Snj
 B6 (C)-H2-Ab1bm12/KhEgJ
 B6.129P2-Il10tm1Cgn/J
 B6.129P2-Nos2tm1Lau/J
 B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
 B6.129S2-Cd8atm1Mak/J
 B6.129S2-Igh-6tm1 Cgn/J
 B6.129S7-Ifngtm1Ts/J
 B6.129S7-Rag1tm1Mom/J
 B6.CB 17-Prkdcscid/SZJ
 B6.MRL-Faslpr/J
 B6. V-Lepob/J
 BKS.Cg-m +/- Leprdb/J
 C3HeB/FeJ
 C57BL/10J
 C57BL/10SnJ
 C57BL/6-Tg (APOA1) 1 Rub/J
 C57BL/6J-Tyrc-2J/J
 CBA/Cahn-Btkxid/J
 CBA/CaJ
 CBySmn.CB17-Prkdcscid/J
 FVB/N-Tg (MMTVneu) 202Mul/J
 KK.Cg- Ay/J
 MRL/MpJ
 MRL/MpJ -Faslpr/J
 SJL/J

Comité Internacional de
 Nomenclatura Estandarizada para
 ratones ha dictaminado que una
 cepa de ratones puede ser
 considerada "endogámica" en la
 generación F₂₀

Todas las mutaciones/modificaciones genéticas (por ejemplo, transgénico, knockout, knockin, knockdown, retroviral, viral) mutaciones inducidas químicamente (por ejemplo, ENU, EMS también incluyendo archivos de mutantes); mutaciones inducidas por radiación; mutaciones/modificaciones espontáneas mantenidos en cepas de ratón, por ejemplo: C57BL/6, 129, FVB, C3H, NOD, DBA/2, BALB/c, CD-1, incluyendo cepas congénicas y cepas congénicas recombinantes. Cepas híbridas de ratón producidas por el cruce de dos cepas endogámicas incluyendo cepas endogámicas mixtas	SWR/J B10.PL-H2U H2-T18a/(73NS) Snj NONcNZO5/LTJ WR BPH/2 BPL/1 FS P/J P/A PRO Ejemplos: B6.129P2-Apoetm1Unc/J, B6.129S4-Pdyn^{tm1Ute}/J, B6; 129P2-Pemt^{tm1J}/J, NOD.Cg Prkdc^{scid}-. B2m^b/Dvs	
	Ratones: NZBWF1/J B6CBAF1/J B6SJLF1/J CB6F1/J CByB6F1/J PLSJLF1/J WBB6F 1/J-KitW/KitW-v B6129PF1/J CAF1/J B6129PF2/J B6129SF1/J B6129SF2/J B6AF1/J B6C3F1/J B6CBAF1/J B6SJLF1/J (incluyendo cualquier otra combinación) proporciones varían de 50:50 F1 a 99:1	
Ratones exogámicos	CD-1; ICR; Negro suizo; Webster suizo; NIH suizo; CF-1, Desnudo	Definición exogámico: animales procedentes de una población definida que son producidos por sistemas de cría que evitan cruces entre individuos estrechamente relacionados con el fin de mantener el máximo nivel de heterocigosidad en toda la descendencia
LÍNEAS RATAS ENDOGÁMICAS Todas las mutaciones/modificaciones genéticas (por ejemplo, transgénico, knockout, knockin, knockdown, retroviral, viral), mutaciones inducidas químicamente (por ejemplo, ENU, también incluyendo	ACI, Brown Norway (BN), BCIX, Copenhagen (COP) , MWF, D Agouti (DA), Goto-Kakizaki (GK), Lewis, Fischer 344 (F344), Wistar Furth (WF), Wistar Kyoto (WKY; WKYN1), ZDF F344/NTAC-Tg (HLA -B27)-Tg (2M) 33-3Trg; HsdAmc: TR-Abcc2; HsdHlr: ZUCKER-Leprfa; NIH Desnudo	

archivos de mutantes); mutaciones inducidas por radiación; mutaciones/modificaciones espontáneas mantenidos en cepas de rata, incluyendo cepas congénicas. Híbridos de ratas producidas mediante cruce de dos cepas endogámicas	BHR FBNF1/Hsd LBNF1/Hsd	
Ratas exogámicas	Holtzman, Sprague Dawley, Long Evans, Wistar, Wistar Han, WH, WKY, Zucker, JCR (Russel Rat), OFA	Definición exogámico: animales procedentes de una población definida que son producidos por sistemas de cría que evitan cruces entre individuos estrechamente relacionados con el fin de mantener el máximo nivel de heterocigosidad en toda la descendencia
Todas las mutaciones/modificaciones genéticas (por ejemplo, transgénico, knockout, knockin, knockdown, retroviral, viral), mutaciones inducidas químicamente (por ejemplo, ENU, también incluyendo archivos de mutantes); mutaciones inducidas por radiación; mutaciones/modificaciones espontáneas mantenidos en mamíferos. Otros roedores	Conejo, cabra, oveja, cerdo, vaca, caballo, perro, gato	
Todas las mutaciones/modificaciones genéticas (por ejemplo, transgénico, knockout, knockin, knockdown, retroviral, viral), mutaciones inducidas químicamente (por ejemplo, ENU, también incluyendo archivos de mutantes); mutaciones inducidas por radiación; mutaciones/modificaciones espontáneas mantenidos en vertebrados	Jerbos, cobayas, hámsteres, rata de algodón peces (por ejemplo, pez cebra, medaka, salmón, tilapia, siluro, atún); pollo, pavo	
Vacas	como poblaciones exogámicas o poblaciones de crianza aleatoria	
Cerdos	como poblaciones exogámicas o poblaciones de crianza aleatoria	
Cabras	como poblaciones exogámicas o poblaciones de crianza aleatoria	
Caballos	como poblaciones exogámicas o poblaciones de crianza aleatoria	
Humanos	como poblaciones exogámicas o poblaciones de crianza aleatoria	
Otros mamíferos	perros, gatos, camélidos, primates no humanos, todos como poblaciones exogámicas o poblaciones de crianza aleatoria, animales de zoológico, marsupiales, mamíferos en peligro de extinción	
Otros vertebrados	peces de agua dulce (por ejemplo, ciprínidos, siluroideos, salmónidos, tilapias, medaka, pez cebra), peces marinos (por ejemplo, arenque, anguila, lubina, lenguado, mero, ronco, trucha de mar, "drums",	

corvina, pescadilla, delfín, caballas,
atunes, pargos, pez espada, mero,
pescado azul, macabí, peces
picudos, sábalos, pargo, lisas,
tiburones, megalops peces
tropicales); aves en peligro de
extinción (gallo, pavo, pato, ganso,
codorniz, faisán, gallina de guinea,
palomas, pájaros de compañía, aves
en peligro de extinción

REFERENCIAS

[0109]

- 5 BATH, "Simple and efficient in vitro fertilization with cryopreserved C57BL/6J mouse sperm," (2003), Biol Reprod 68(1): 19-23.
- GLENISTER, et al., "Cryoconservation--Archiving for the future," (2000), Mammalian Genome 11, 565-571.
- NAKAGATA, "Cryopreservation of mouse spermatozoa," (2000a), Mammalian Genome 11, 572-576.
- 10 NAKAGATA, "Mouse Spermatozoa Cryopreservation," (2000b), J Mamm Ova Res 17, 1-8.
- NAKAGATA, et al., "Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains," (1993), Jikken dobutsu Experimental animals 42, 317-320.
- QUINN, P., et al., "Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate" (1995).
- 15 The antioxidant action of synthetic oestrogens involves decreased membrane fluidity: relevance to their potential use as anticancer and cardioprotective agents compared to tamoxifen? J Assist Reprod Genet 12, 97-105.
- SONGSASEN, et al., "Cryopreservation of Mouse Spermatozoa II. Relationship between Survival after Cryopreservation and Osmotic Tolerance of Spermatozoa from Three Strains of Mice," (1997), Cryobiology 35, 255-269.
- 20 SZCZYGIEL, et al., "Intracytoplasmic sperm injection is more efficient than in vitro fertilization for generating mouse embryos from cryopreserved spermatozoa," (2002), Biology of Reproduction 67, 1278-1284.
- SZTEIN, et al., "Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation," (2001), Cryobiology 42, 28-39.
- THORNTON, et al., "Large numbers of mice established by in vitro fertilization with cryopreserved spermatozoa: Implications and applications for genetic resource banks, mutagenesis screens, and mouse backcrosses," (2006), Mammalian Genome 10, 987-992.
- 25 BYERS, et al., "Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs)," (2006), Theriogenology 65(9): 1716-26.
- SZTEIN, et al., "In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm," (2000), Biol Reprod 63(6): 1774-80.
- 30 NAKAGATA, "Cryopreservation of mouse spermatozoa," (2000a), Mammalian Genome 11, 572-576.
- NAKAGATA, "Mouse Spermatozoa Cryopreservation," (2000b), J Mamm Ova Res 17, 1-8.
- NEILD D M, Brouwers J F, Colenbrander B, Aguero A, Gadella B M (2005). Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. Mol Reprod Dev.72(2):230-8.
- GUTHRIE H D, Welch G R (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. J Anim Sci. 84(8):2089-100.
- 35

REIVINDICACIONES

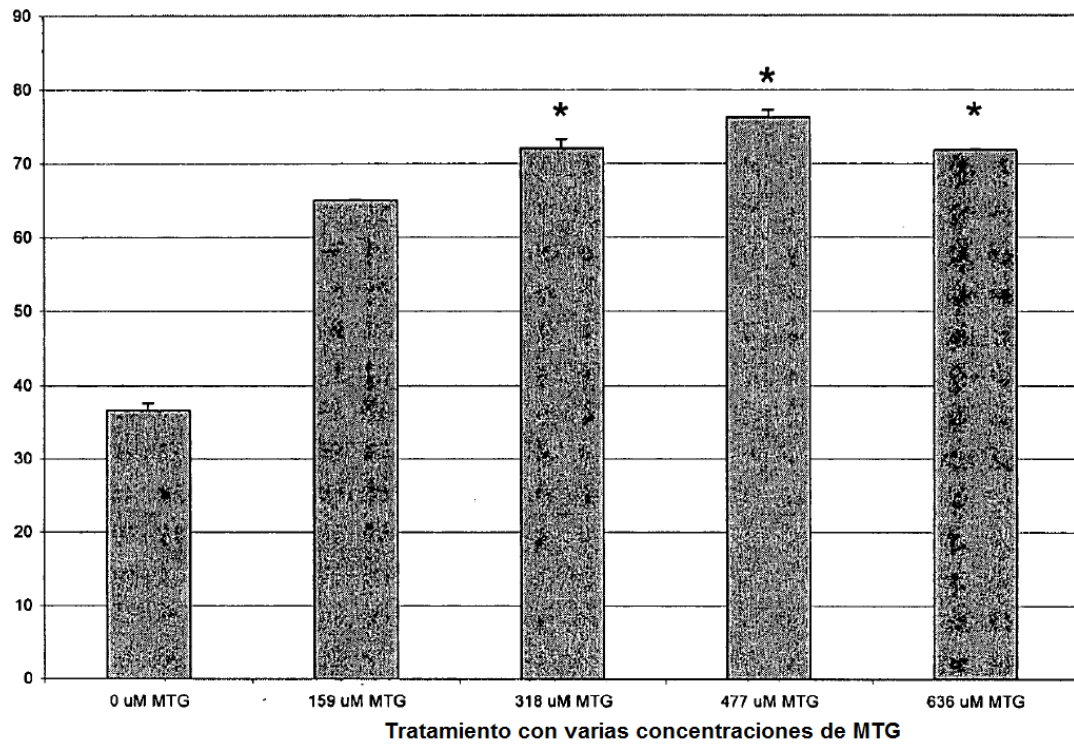
1. Procedimiento para conservar criogénicamente esperma, que comprende añadir al esperma, antes de la
crioconservación, una composición que comprende al menos un crioprotector, al menos un protector de membrana y
monotioglicerol.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el crioprotector se selecciona del grupo que consiste en
azúcar, preferiblemente rafinosa, lactosa, trehalosa, melibiosa, melezitosa, manotriosa, estaquiosa, dextrano,
sacarosa, y alcoholes de azúcar de los mismos, glicerol, preferiblemente maltitol y lactitol, más preferiblemente de
rafinosa o lactosa.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el protector de membrana es una proteína seleccionada del
grupo que consiste en proteína de huevo, proteína de yema de huevo, proteína de clara de huevo, caseína,
albúmina, queratina, colágeno, atelocolágeno, elastina, gelatina, peptonas, fibrinógeno, fibronectina, una proteína de
soja, una proteína de trigo, una proteína de maíz, una proteína de la leche, y los hidrolizados de los mismos, o en el
que el protector de membrana es leche desnatada o un componente del mismo; leche en polvo o un componente del
mismo; o yema de huevo o un componente del mismo.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la composición comprende monotioglicerol en una
concentración de 50 micromolar a 50000 micromolar, y opcionalmente comprende además ditiotreitól o beta-
mercaptoetanol, o un antioxidante, preferiblemente glutatión reducido, más preferiblemente glutatión reducido en una
concentración de 50 micromolar a 50000 micromolar.
5. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la concentración del azúcar es del 10% en peso/volumen al
30% en peso/volumen o del 10% volumen/volumen al 90% volumen/volumen.
6. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la concentración de la proteína es del 1% en peso/volumen al
50% en peso/volumen o del 1% volumen/volumen al 90% volumen/volumen.
7. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que el azúcar es rafinosa o lactosa, la proteína es proteína de la
leche, una proteína en la leche, proteína de huevo, proteína de yema de huevo o proteína de clara de huevo y el
captador de radicales libres es monotioglicerol.
8. Procedimiento para conservar criogénicamente esperma, según la reivindicación 1, que comprende añadir al
esperma, antes de la crioconservación, una composición que comprende al menos un azúcar, al menos un protector
de membrana y monotioglicerol, en el que el azúcar es preferiblemente rafinosa o lactosa; el protector de membrana
es preferiblemente yema de huevo, leche desnatada, leche o un componente de los mismos.
9. Procedimiento de producción de esperma que tiene mayor capacidad de fecundación después de la conservación
criogénica, que comprende:
(a) combinar el esperma con una composición, en la que la composición comprende al menos un crioprotector, al
menos un protector de membrana y monotioglicerol, produciendo de este modo una combinación; y
(b) crioconservar la combinación, produciendo de este modo una combinación crioconservada que comprende
esperma crioconservado.
10. Composición conservada criogénicamente que comprende (a) esperma de mamífero no humano y (b) una
composición para la conservación criogénica de esperma, en la que la composición comprende al menos un
crioprotector, al menos un protector de membrana y monotioglicerol.
11. Composición conservada criogénicamente, según la reivindicación 10, en la que el esperma de mamífero no
humano es esperma de roedor, preferiblemente esperma de ratón o de rata, en la que el crioprotector es rafinosa o
lactosa, y el protector de membrana es leche en polvo o yema de huevo.
12. Composición, según la reivindicación 10, que comprende además un agente reductor, seleccionado
preferiblemente del grupo que consiste en: beta-mercaptoetanol, ditiotreitól, Tris(2-carboxietil)fosfina, ditioueritritol,
tiorredoxina, ditionito, 2-mercaptoetilamina, dimetil tiourea, DMSO, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), 2,3-
dimercapto-1-propanol o hidroquinona, o un antioxidante, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en un
aminoácido, una vitamina, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido dihidrolipoico, tetrahidropapaverolina,
ácido 2-tiobarbitúrico o taurina, ácido dimercaptosuccínico, alopurinol, deferoxamina, melatonina, catalasa, glutatión
peroxidasa, superóxido dismutasa, esteroides, glutatión reducido, preferiblemente de 50 micromolar a 50000
micromolar, y combinaciones de los mismos.
13. Composición, según la reivindicación 10, en la que el esperma de mamífero no humano se aísla de un roedor o
bovino, más preferiblemente de ratón o una rata o ganado, o un hámster, una cobaya, un gato, un perro, una cabra,
un caballo, un camello, un cerdo, un conejo o una oveja.

14. Composición para la conservación criogénica de esperma, que comprende al menos un crioprotector, al menos un protector de membrana y monotioglicerol, preferiblemente en una concentración de 50 micromolar a 50000 micromolar, en la que la composición no comprende esperma humano.
- 5 15. Composición, según la reivindicación 10 o 14, en la que el crioprotector es un azúcar, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en: rafinosa, lactosa, trehalosa, melibiosa, melezitosa, manotriosa, estaquiosa, dextrano, hidroxietil almidón, sacarosa, maltitol, lactitol, glicerol y otros alcoholes de azúcar, lo más preferiblemente, rafinosa o lactosa, o en la que el crioprotector se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, DMSO, etilenglicol, propilenglicol, polivinilpirrolidona, glicerol y óxido de polietileno.
- 10 16. Composición, según la reivindicación 10 o 14, en la que el protector de membrana es una proteína seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en: caseína, albúmina, queratina, colágeno, atelocolágeno, elastina, gelatina, peptonas, fibrinógeno, fibronectina, proteína de huevo, proteína de yema de huevo, proteína de clara de huevo, una proteína de soja, una proteína de trigo, una proteína de maíz, proteína de leche, un hidrolizado de las mismas y una combinación de las mismas, o en la que el protector de membrana es leche desnatada o un componente de la misma; leche en polvo o un componente de la misma; o yema de huevo o un componente de la misma, o una sustancia no proteica o una combinación de una proteína y una sustancia no proteica, o en la que el protector de membrana se selecciona del grupo que consiste en un lípido, un lípido sintetizado químicamente y un lípido sintético, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, 1,1',2,2'-tetra-acil-cardiolipina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, un lípido a base de polioxietileno, ácidos grasos de linoleico, araquidónico, linolénico, mirístico, oleico, palmítico o esteárico, colesterol, Pluronic F-68, alcohol polivinílico y combinaciones de los mismos.
- 15 17. Composición, según la reivindicación 15, en la que la concentración del azúcar en la composición es del 10% en peso/volumen al 30% en peso/volumen, o del 10% volumen/volumen al 90% volumen/volumen.
- 20 18. Composición, según la reivindicación 10 o 14, en la que la concentración del protector de membrana es del 1% en peso/volumen al 50% en peso/volumen o del 1% volumen/volumen al 90% volumen/volumen.
- 25 19. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 14-18, o el procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en los que el esperma se aísla de un vertebrado, preferiblemente de un mamífero, más preferiblemente de un roedor o bovino, lo más preferiblemente de ratón o una rata o ganado, o un hámster, una cobaya, un gato, un perro, una cabra, un caballo, un camello, un cerdo, un conejo o una oveja.
- 30 20. Procedimiento, según la reivindicación 19, en el que el ratón es una cepa de ratón, seleccionada preferiblemente de C57BL, BALB/c, FVB, 129, C3H, CBA, DBA y NOD, o subcepa, seleccionada preferiblemente de C57BL/6, BALB/c, FVB/N, 129X1/Sv y 12951/svim.
- 35 21. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 14-19, que comprende además esperma de mamífero no humano.
- 40 22. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición conservada criogénicamente, según las reivindicaciones 10-12, en los que el vertebrado o mamífero es un vertebrado modificado genéticamente o un mamífero modificado genéticamente, o en los que el roedor es un roedor modificado genéticamente, y lo más preferido es un ratón, rata, hámster, cobaya, gato, perro, cabra, caballo, ganado, camello, cerdo, conejo u oveja modificados genéticamente.
- 45 23. Kit para usar en la crioconservación de esperma que comprende la composición, según la reivindicación 14, o que comprende por separado los siguientes componentes:
(a) al menos un crioprotector;
(b) monotioglicerol; y
(c) al menos un protector de membrana.
- 50 24. Kit, según la reivindicación 23, en el que el monotioglicerol tiene una concentración de 50 micromolar a 50000 micromolar.
- 55 25. Kit, según la reivindicación 23, que comprende además un recipiente criogénico, un recipiente para el esperma, en el que el recipiente es preferiblemente una pajuela, una ampolla de vidrio, un criotubo o un criovial.
- 60 26. Kit, según la reivindicación 25, en el que dicho al menos un crioprotector se selecciona del grupo que consiste en un azúcar, preferiblemente rafinosa, lactosa, trehalosa, melibiosa, melezitosa, manotriosa, estaquiosa, dextrano, hidroxietil almidón, sacarosa, maltitol, lactitol, glicerina, y combinaciones de los mismos; o en el que dicho al menos un crioprotector se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, DMSO, etilenglicol, propilenglicol, polivinilpirrolidona, óxido de polietileno, y combinaciones de los mismos; o en el que dicho al menos un protector de membrana se selecciona del grupo que consiste en caseína, albúmina, queratina, colágeno, atelocolágeno, elastina, gelatina, peptonas, fibrinógeno, fibronectina, yema de huevo o un componente de los mismos, una proteína de soja, una proteína de trigo, una proteína de maíz, leche, leche en polvo, leche desnatada o un componente de los
- 65

5 mismos, una proteína de la leche o un componente de la misma, un hidrolizado de uno de los anteriores, y combinaciones de los mismos; o en el que dicho al menos un protector de membrana se selecciona del grupo que consiste en un lípido, un lípido sintetizado químicamente, un lípido sintético, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, 1,1',2,2'-tetra-acil-cardiolipina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, un lípido a base de polioxietileno, ácidos grasos de linoleico, araquidónico, linolénico, mirístico, oleico, palmítico o esteárico, colesterol, Pluronic F-68, alcohol polivinílico y combinaciones de los mismos.

27. Recipiente que comprende la composición, según la reivindicación 14, o un kit según la reivindicación 23.

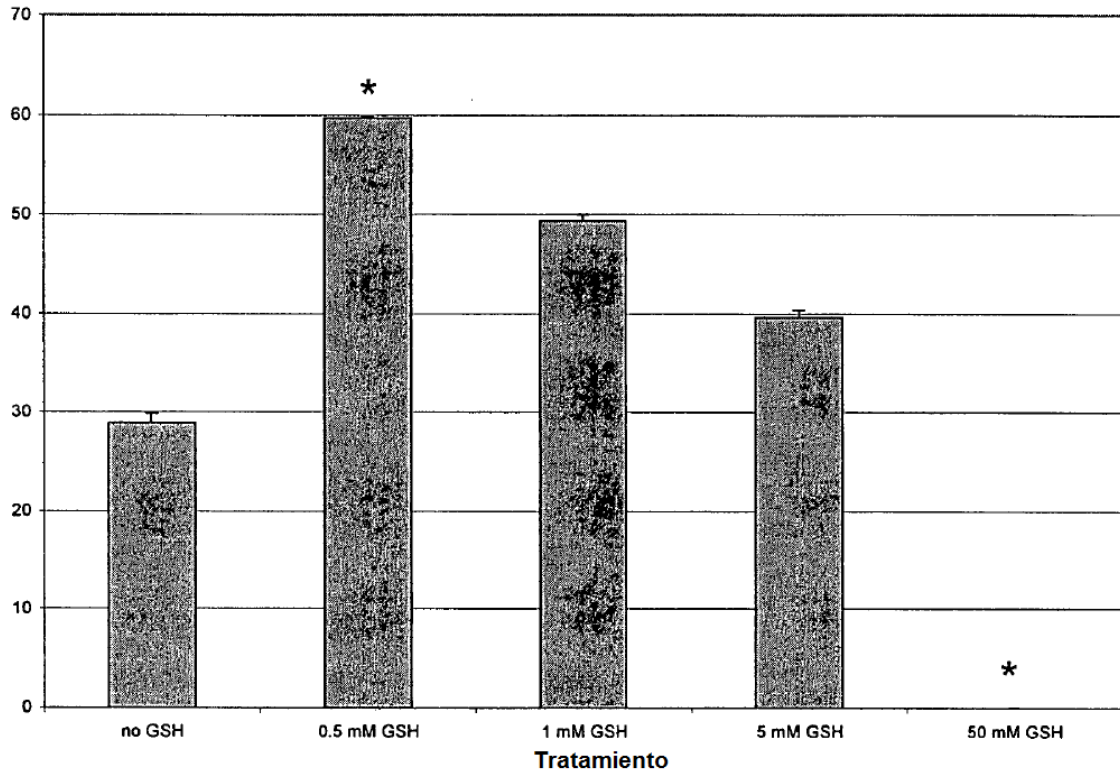
Figura 1: El monotioglicerol mejora la fertilidad de espermatozoides de C57BL/6J criopreservados



Leyenda para el eje X: Concentración de tratamiento con MTG

Leyenda para el eje Y: % de ovocitos que desarrollan embriones de 2 células

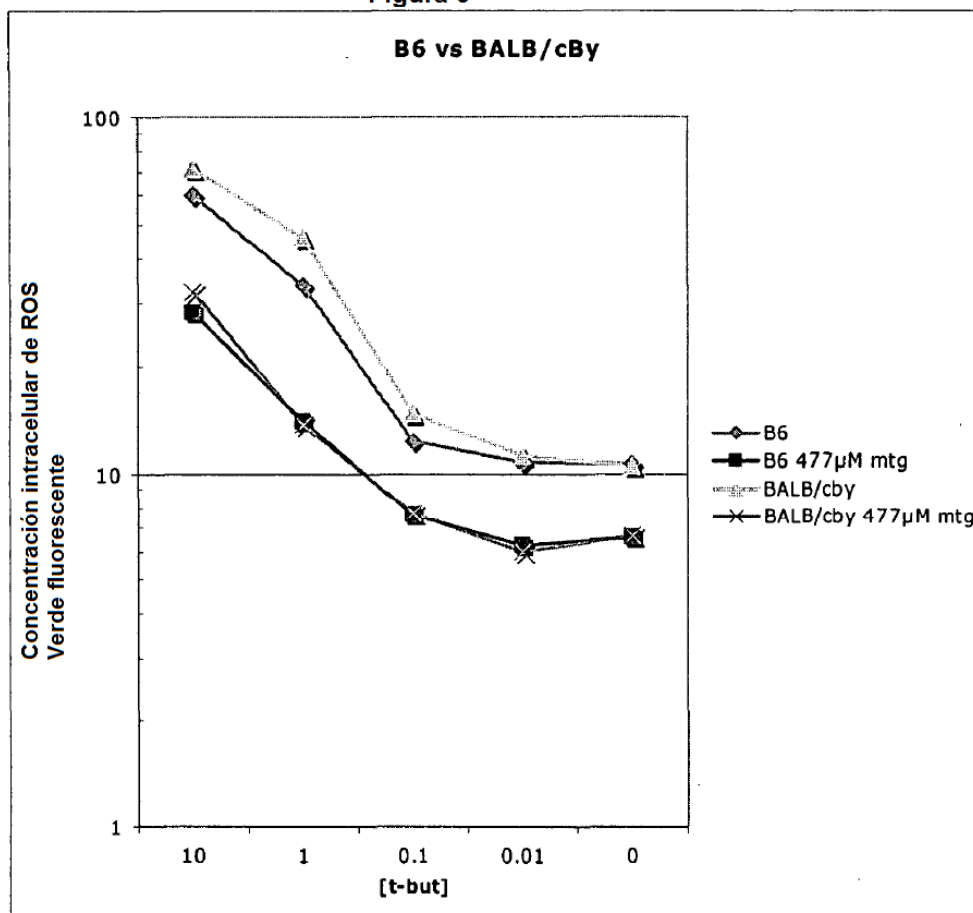
Figura 2: GSH mejora la fertilidad de espermatozoides de C57BL/6J criopreservados



Leyenda para el eje X: Concentración de tratamiento con MTG

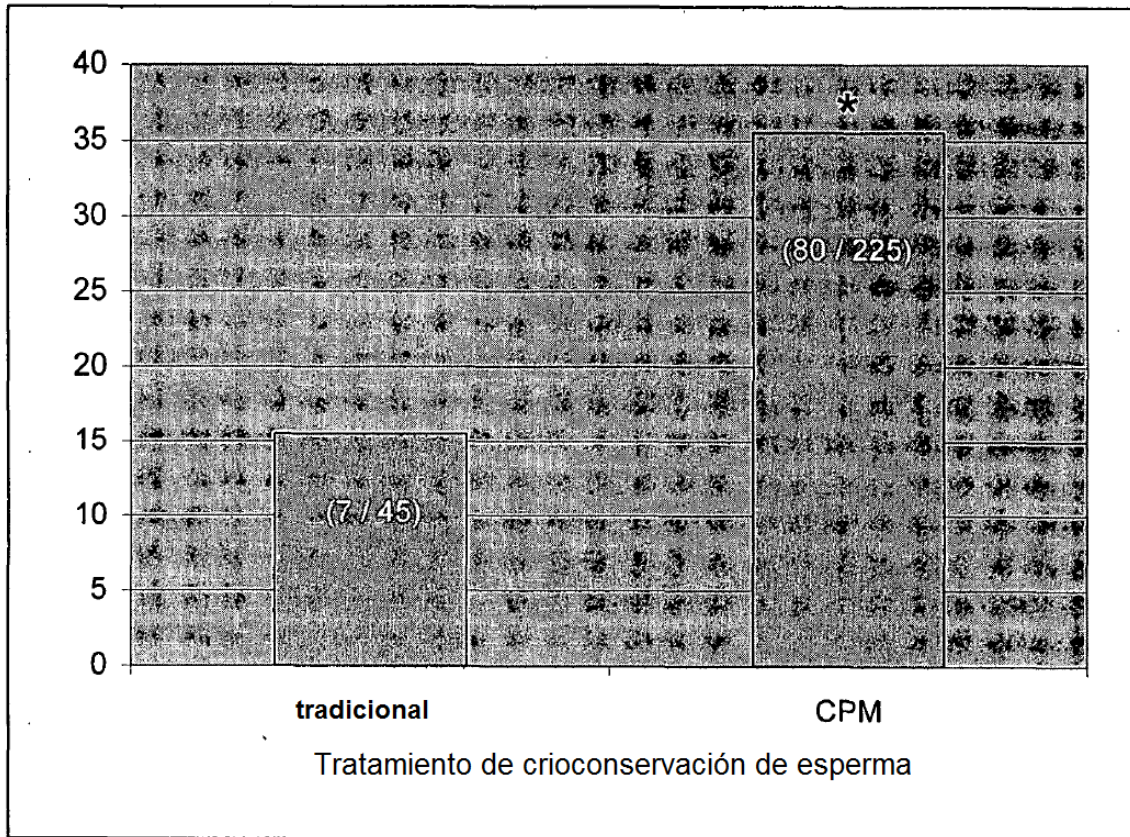
Leyenda para el eje Y: % de ovocitos que desarrollan embriones de 2 células

Figura 3



En esta figura C57BL/6J se abrevia con B6 y BALB/cByJ con BALB/cby

Figura 4



% de embriones transferidos que llegan a nacimiento

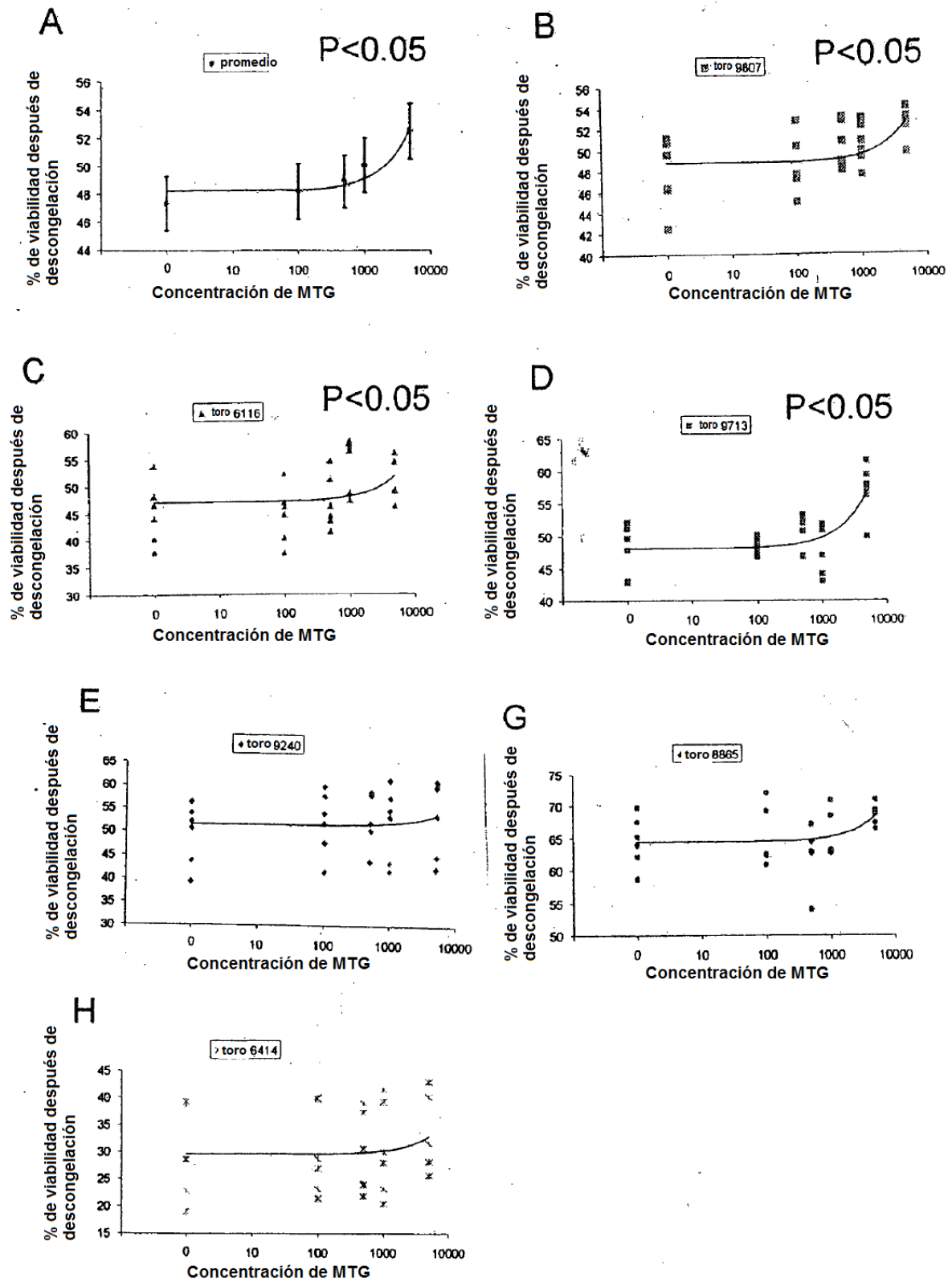
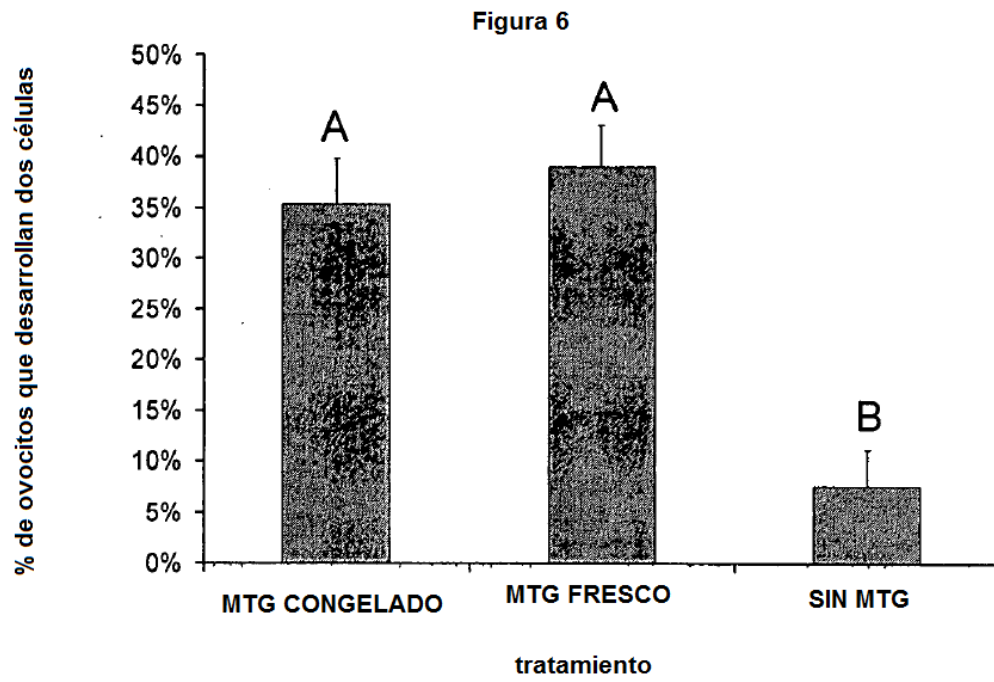


Figura 5



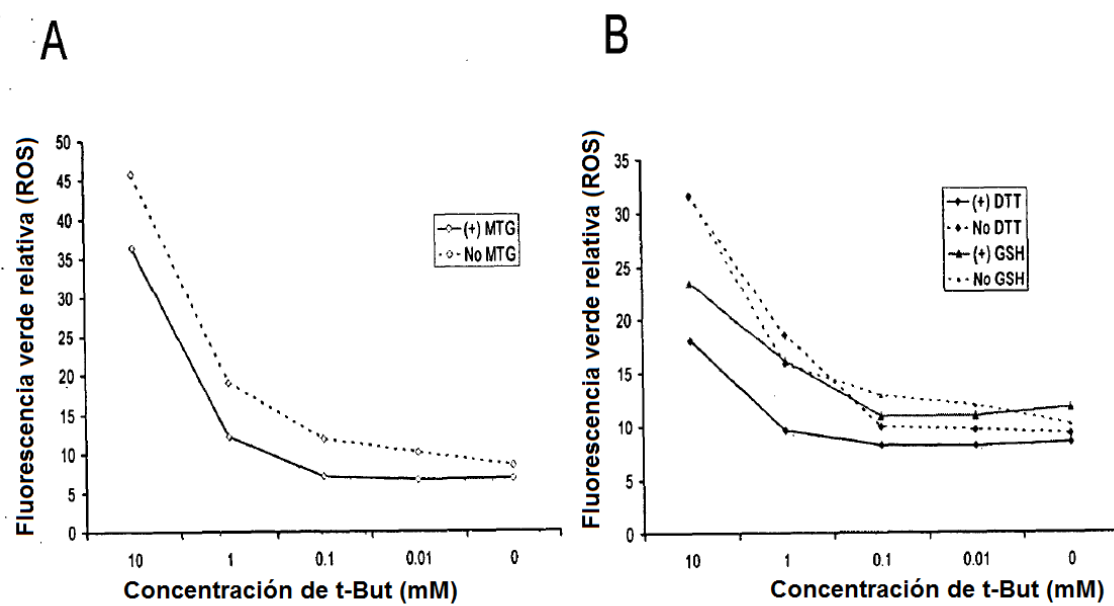


Figura 7

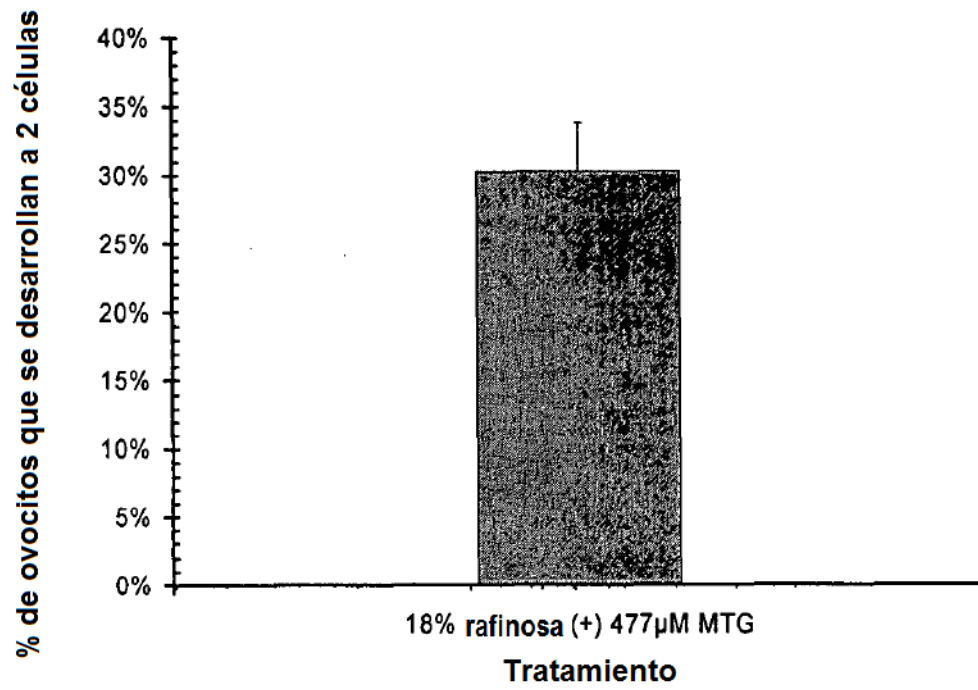


Figura 8