

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 200**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2015 PCT/IB2015/055337**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16009363**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2015 E 15760245 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3169154**

54 Título: **Diluyente para la conservación de semen**

30 Prioridad:

14.07.2014 CO 14151563

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

15.10.2020

73 Titular/es:

**POLITÉCNICO COLOMBIANO JAIME ISAZA
CADAVID (50.0%)**

Carrera 48 No. 7-151

Medellin, CO y

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA (50.0%)

72 Inventor/es:

RESTREPO BETANCUR, GIOVANNI y

ROJANO, BENJAMÍN ALBERTO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 787 200 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

Diluyente para la conservación de semen

Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con un diluyente para la protección, conservación y crioconservación de semen. El diluyente contiene al menos un compuesto citoprotector derivado de isopropilfenoles junto con agentes crioprotectores y coadyuvantes que permiten incrementar la movilidad, vitalidad y funcionalidad de los espermatozoides.

Estado de la técnica

10 En los procesos biotecnológicos que involucran la manipulación, mantenimiento, conservación o crioconservación de células reproductivas, éstas sufren un rápido deterioro a causa de diferentes factores, lo que hace que pierdan integridad estructural y funcional, reduciendo así la eficiencia de los procedimientos en los que son utilizadas.

15 Los espermatozoides son células que poseen una alta movilidad y son metabólicamente muy activas. Uno de los factores más relacionados con la baja fertilidad de los espermatozoides es el estrés oxidativo (1), el cual ocasiona una pérdida importante en su movilidad, viabilidad y disminución de su capacidad para la fertilización (2, 3). Adicionalmente, el semen es extremadamente sensible a las alteraciones celulares generadas por la congelación (4, 5).

20 Una estrategia para disminuir estos efectos es almacenar el semen en medios o diluyentes que además de ser ricos en nutrientes, presenten las propiedades físicas y químicas apropiadas para su conservación. Particularmente, los espermatozoides requieren de varios componentes esenciales para su conservación, entre ellos, azúcares, proteínas, crioprotectores, sistemas amortiguadores y electrolitos.

25 Con el fin de alcanzar una conservación adecuada del semen y sus células, el diluyente debe contener compuestos antioxidantes para reducir el daño originado por especies reactivas, tales como radicales libres, y conservar así las células reproductivas durante largos periodos de tiempo. La mayoría de los antioxidantes descritos hasta ahora no tienen la suficiente capacidad protectora ya que, por lo general, escasamente un 30 % de los espermatozoides conservan su integridad y movilidad.

En un estudio previo (1) se mezclaron antioxidantes como α -tocoferol, ácido ascórbico, albúmina sérica bovina y TEMPO con semen equino sometido a congelación. No se encontraron resultados positivos en la movilidad espermática durante la crioconservación, en tanto que la inclusión de BHT como antioxidante redujo significativamente la movilidad progresiva de los espermatozoides.

30 En algunas publicaciones, los investigadores evaluaron la adición de compuestos antioxidantes (por ejemplo glutatión reducido, catalasa y superóxido dismutasa) a diluyentes para semen y concluyeron que no mejoran de manera significativa la movilidad, fragmentación del ADN, vitalidad y actividad mitocondrial de los espermatozoides equinos descongelados (6). De igual forma, otros investigadores han evaluado el efecto de añadir acetil-cisteína y glutatión peroxidasa al semen equino antes de su congelación y no encontraron efectos importantes (7).

35 Otros compuestos con acción antioxidante han demostrado no tener efecto sobre la calidad del semen crioconservado e, incluso, han tenido efectos nocivos. En un estudio donde se utiliza N-acetil-cisteína como antioxidante para el almacenamiento de semen equino, los investigadores no encontraron efectos beneficiosos en la movilidad total, movilidad progresiva o integridad de la membrana plasmática de las células al cabo de 24, 48 y 72 horas (8). La utilización de la enzima catalasa (2) o de altas concentraciones de ácido ascórbico (9), tampoco presenta ninguna ventaja y, por el contrario, afecta negativamente a la movilidad de los espermatozoides.

40 Adicionalmente, el piruvato y el lactato usados como antioxidantes en semen equino refrigerado no evitaron los efectos perjudiciales del peróxido de hidrógeno (10). Los autores concluyeron que la lactoferrina usada como antioxidante suplementario en un diluyente basado en leche y caseinatos, no tenía efecto sobre la movilidad, integridad de la membrana o los niveles de óxido nítrico en semen equino refrigerado (11).

45 El documento US8435730 describe un diluyente para semen que incluye fosfolípidos, un tensioactivo para reducir la formación de cristales de hielo durante la congelación, un carbohidrato, un sistema amortiguador y glicerol o dimetilsulfóxido. Adicionalmente el diluyente allí divulgado puede contener hasta un 3,0 % p/p de antioxidantes, tales como vitamina E, vitamina C, vitamina A, BHA y BHT.

50 El documento US20060257842 divulga medios y moléculas para crioconservación de células, incluyendo, espermatozoides, las cuales protegen regiones específicas de la membrana celular, permiten su reparación, mantienen la producción de metabolitos y de paso actúan como antioxidantes para favorecer la integridad y supervivencia de las células. Entre las moléculas divulgadas está la glicerilfosforilcolina, glicerofosfoinositol, ácido eicosapentenoico, trehalosa, betaína, taurina y acetil-L-carnitina.

J. Roca *et al.* ("Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene" ["Supervivencia y fertilidad de los espermatozoides de jabalí después de congelar-descongelar en un extensor suplementado con hidroxitolueno butilado"] *Journal of Andrology*, 2004, 25(3), 397-405) divulgaron composiciones para uso como extensores de semen que comprenden el antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT).

5 Uno de los procedimientos más importantes para la reproducción asistida es la crioconservación del semen, ya que permite su transporte y almacenamiento a largo plazo (12). Se emplean diversos métodos para la crioconservación del semen, los cuales varían principalmente en las velocidades de descenso de temperatura, los soportes de almacenamiento y los crioprotectores empleados. Algunos productos comerciales para la conservación de semen como INRA96^{®1}, GENT^{®2}, EQUIPRO^{®3} y BOTUCRIO^{®4} son ampliamente utilizados. (¹<http://www.inra.fr/>,
10 ²<http://www.minitube.de/>, ³<http://www.minitube.de/>, ⁴<http://nidacon.com/>)

Los crioprotectores son esenciales para la supervivencia de los espermatozoides sometidos a bajas temperaturas, de manera que la composición y naturaleza química de los mismos son aspectos fundamentales. Su función es deshidratar las células y disminuir la temperatura de congelación del agua en el interior de las células, reduciendo así las alteraciones ocasionadas por los cristales de hielo en las diferentes estructuras y organelos.

15 Varios crioprotectores han sido evaluados en el proceso de crioconservación, entre ellos, glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, dimetilformamida, entre otros (13, 14, 15). La metilformamida y dimetilformamida pueden penetrar con mayor facilidad las membranas por su bajo peso molecular con respecto a crioprotectores convencionales con mayor citotoxicidad osmótica como el glicerol (16).

20 De igual forma, se ha estudiado la inclusión de sustancias que contienen proteínas, que actúan como protectores extracelulares, en los diluyentes. Entre los que se encuentran la yema de huevo (17), albúmina sérica bovina, suero equino, suero bovino, proteína de soja, alcohol polivinílico (18) y leche descremada ultra pasteurizada (19).

25 El esperma de mamíferos presenta una drástica disminución de su capacidad fecundante cuando es sometido a crioconservación (20, 21). A pesar de los múltiples esfuerzos por optimizar la crioconservación de semen, varias investigaciones recientes han demostrado que no se ha logrado mejorar significativamente la capacidad fecundante de los espermatozoides, por lo que la calidad del semen crioconservado aún sigue siendo muy reducida (15, 16, 17, 22, 23, 24).

Breve descripción del invento

30 Para solucionar este problema técnico, los inventores evaluaron el efecto de la inclusión de compuestos derivados del isopropilfenol en diluyentes para conservar el semen. Estos compuestos han demostrado ser buenos agentes crioprotectores y tener excelentes propiedades antioxidantes.

La incorporación de estos compuestos antioxidantes en un diluyente para semen logra reducir drásticamente la cantidad de especies reactivas y mejorar todos los parámetros de calidad seminal tras la descongelación. Isopropilfenoles como timol (2-isopropil-5-metilfenol), carvacrol e isoespintanol (2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol) demostraron ser muy eficaces.

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un diluyente o medio de conservación de semen que contiene al menos un compuesto antioxidante derivado del isopropilfenol como citoprotector, junto con uno o más crioprotectores y coadyuvantes como se define en la reivindicación 1.

40 El antioxidante se selecciona del grupo de: isoespintanol (2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol), carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) y mezclas de los mismos. Adicionalmente, el diluyente de la invención incluye uno o más crioprotectores seleccionados de etilenglicol, metilformamida, dimetilformamida, dietilformamida, yema de huevo y mezclas de los mismo, así como coadyuvantes seleccionados de glucosa, fructosa, sacarosa, lípidos saturados y/o insaturados, caseínas, albuminas, plasma seminal, vitamina E, vitamina C, vitamina A, sistema tampón fosfato, sistema tampón tris, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, cafeína, pentoxifilina, taurina, gentamicina, penicilina, estreptomina y mezclas de los mismos.
45

El timol se encuentra en la naturaleza en aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgare*) y orégano (*Origanum vulgare*). El potencial antioxidante de los extractos de orégano se le atribuye al timol y a su isómero carvacrol y ha sido determinado por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, protegiendo el ADN del daño causado por radicales hidroxilo. Estos extractos son mucho más eficaces que otros antioxidantes como propilgalato, BHT y BHA (25).

50 También se han descrito otras propiedades del timol y del carvacrol (26, 27, 28). En distintos estudios con modelos animales se ha demostrado que el carvacrol y el timol poseen propiedades anticarcinogénicas, actuando a diferentes niveles celulares y moleculares (28, 29).

El isoespintanol (2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol) es un monofenol derivado biosintético del timol, que se puede obtener del extracto etéreo de las hojas de *Oxandra cf xylopioides* (1,5 % en base seca) y tiene excelentes propiedades

antioxidantes. Actúa como un buen agente reductor, con una alta capacidad para atrapar radicales libres en diferentes medios (30).

5 Las propiedades antioxidantes de estos compuestos se deben a un mecanismo vía transferencia de un átomo de hidrogeno (HAT). Se ha demostrado que el isoespintanol es uno de los isopropilfenoles con más capacidad de capturar radicales libres. Resultados obtenidos con ensayos del potencial antioxidante reductor férrico (FRAP) y de la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), demostraron que el isoespintanol tiene por lo menos dos veces más actividad antioxidante que el timol, debido al efecto de los sustituyentes del anillo aromático y a la formación de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares (31).

10 Como antioxidante natural, el isoespintanol reacciona frente al radical DPPH•, con una velocidad similar a la del BHT, uno de los antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria alimenticia y farmacéutica. En alimentos como la mantequilla, por ejemplo, el isoespintanol inhibe la peroxidación a concentraciones similares al BHT. Adicionalmente, se ha encontrado que el isoespintanol también tiene propiedades antiinflamatorias, ya que reduce en un 43 % la inflamación inducida por carragenina en las patas de algunos roedores, disminuyendo hasta en un 72 % la producción de interleuquina-1β.

15 El isoespintanol en el diluyente de la presente invención, mejora los parámetros de calidad del semen tales como la movilidad, la viabilidad, la integridad de membrana y la actividad mitocondrial después de la criopreservación. El diluyente de la invención permite el almacenamiento de células en condiciones de criopreservación (refrigeración, congelación o vitrificación), logrando reducir las alteraciones de la supervivencia de las células, su integridad y funcionalidad, potenciando su uso en reproducción asistida o aplicaciones biotecnológicas.

20 En una realización preferida de la invención, la concentración de isopropilfenoles en el diluyente para la conservación de semen está entre 10 μM y 300 μM, lo que inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS "Reactive Oxygen Species") y reduce la peroxidación lipídica, prolongando así la supervivencia y funcionalidad de las células espermáticas *in vitro*.

25 Una dilución en el intervalo de 1:1 hasta 1:10 de semen con respecto al diluyente de la presente invención prolonga la conservación de los espermatozoides y permite que éstos sean utilizados de manera más eficaz en la inseminación artificial o producción de embriones, gracias al efecto citoprotector de los isopropilfenoles.

30 En la realización preferida, el diluyente de la invención además contiene otros componentes tales como carbohidratos (glucosa, fructosa y/o sacarosa), lípidos (saturados y/o insaturados), proteínas (caseínas, albúminas y/o plasma seminal), vitaminas (E, C, A), sistemas amortiguadores (fosfato, tris), antioxidantes (ácido ascórbico, α-tocoferol, β-caroteno), potenciadores (cafeína, pentoxifilina, taurina), antibióticos (gentamicina, penicilina, estreptomina, anfotericina) y un vehículo farmacéuticamente aceptable (disolución equilibrada e isotónica de electrolitos).

Los siguientes ejemplos ilustran con mayor detalle la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 (Ejemplo de Referencia)

35 El diluyente de la presente invención se puede preparar a partir de los componentes indicados en la Tabla 1. Se pesa cada uno de los componentes en una balanza analítica y se añaden a un recipiente con 80 mL de agua ultrapura. Luego se homogeniza la mezcla durante 15 minutos y se completa con suficiente agua ultrapura hasta un volumen de 100 mL para obtener la Formulación A.

Tabla 1.

40

| COMPONENTE | CONCENTRACIÓN |
|-----------------------------|----------------------|
| Leche semidescremada | 0,28 % |
| Caseinatos de sodio | 1,57 % |
| Sacarosa | 2,58 % |
| Fructosa | 0,47 %. |
| Glucosa | 2,03 %. |
| Sulfato de gentamicina | 0,10 %. |
| Derivados de Isopropilfenol | 10,0 a 300,0 μM |

| | |
|----------------|---------------|
| Agua Ultrapura | c.s.p. 100 mL |
|----------------|---------------|

EJEMPLO 2 (Ejemplo de Referencia)

5 Se preparan dos diluyentes de acuerdo con el Ejemplo 1 añadiendo a uno de ellos isoespintanol y al otro, timol. Una muestra de semen equino se diluye en proporción 1:1 con cada uno de los diluyentes por separado. Se refrigeraron durante 6 horas y se evaluaron parámetros como la movilidad, la vitalidad y la integridad de la membrana plasmática de las células, obteniendo resultados entre 70 % y 90 % para cada uno de ellos.

EJEMPLO 3 (Ejemplo de Referencia)

10 Se preparan dos diluyentes de acuerdo con el Ejemplo 1 añadiendo a uno de ellos isoespintanol y al otro, timol. Para determinar la capacidad citoprotectora (antioxidante) de cada uno de ellos, se estudió el efecto de añadir diferentes concentraciones de estos compuestos en eyaculados de semen. Se evaluó la inhibición de la producción de ROS y la reducción en la peroxidación lipídica, determinando de esta manera el intervalo de eficacia así como la concentración con máxima inhibición para el timol y el isoespintanol (tablas 2 y 3).

Tabla 2. Resultados de inhibición de la producción de ROS

| <i>CONCENTRACIÓN (µM)</i> | <i>INHIBICIÓN POR TIMOL (%)</i> | <i>INHIBICIÓN POR ISOESPINTANOL (%)</i> |
|---------------------------|---------------------------------|---|
| 20 | 11,7 | 16,0 |
| 40 | 12,3 | 24,2 |
| 50 | 51,2 | 34,5 |
| 60 | 26,0 | 16,9 |
| 80 | 21,0 | 6,1 |
| 100 | 27,6 | 5,6 |

15

Tabla 3. Resultados de inhibición de la peroxidación lipídica

| <i>CONCENTRACIÓN (µM)</i> | <i>INHIBICIÓN POR TIMOL (%)</i> | <i>INHIBICIÓN POR ISOESPINTANOL (%)</i> |
|---------------------------|---------------------------------|---|
| 20 | 48,1 | 21,1 |
| 40 | 47,7 | 29,9 |
| 50 | 40,8 | 29,4 |
| 60 | 36,6 | 51,1 |
| 80 | 47,0 | 42,1 |
| 100 | 28,3 | 29,8 |

20 La inhibición en proporciones considerables de la producción de ROS y de la peroxidación lipídica en el semen fresco diluido con diluyentes suplementados con timol e isoespintanol, demuestra sus efectos citoprotectores. Estos resultados comprueban el potencial antioxidante de estos compuestos en diluyentes para la conservación de semen.

EJEMPLO 4

5 Se prepara un diluyente de acuerdo con el Ejemplo 1 y se le adiciona un 2 % v/v de yema de huevo de gallina. La mezcla se homogeniza durante 15 minutos a temperatura ambiente con un agitador magnético a 800 rpm durante 15 minutos y se adiciona N,N-dimetilformamida en una proporción de 5,0 % v/v manteniendo agitación hasta obtener una formulación B (POLI-CRYO). El diluyente así obtenido es apto para la crioconservación de semen cuando es sometido a bajas temperaturas en protocolos de congelación lenta, rápida o ultrarrápida, permitiendo así su almacenamiento durante periodos muy largos de tiempo.

EJEMPLO 5

10 Se preparan dos diluyentes de acuerdo con el Ejemplo 4, uno con isoespintanol (20µM) y otro con timol (50 µM). El ejemplo que usa timol es solo para comparación. Una muestra de semen equino se centrifugó para retirar el plasma seminal, el precipitado fue diluido con cada diluyente hasta alcanzar una concentración aproximada de 100 millones de espermatozoides/mL y se suplementó con plasma seminal equino (10 % v/v).

A cada muestra se le realizó un protocolo de congelación rápida al someterlo durante 20 minutos a 5°C y durante 15 minutos a vapor de nitrógeno líquido. Se midió la producción de ROS después de la descongelación del semen. Los resultados, comparados con un diluyente comercial EQUIPRO®, fueron los siguientes (Tabla 4):

15 Tabla 4. Resultados de producción de ROS en semen descongelado.

| <i>DILUYENTE</i> | <i>n</i> | <i>PRODUCCIÓN DE ROS (URF)</i> | <i>VELOCIDAD PRODUCCIÓN (ROS/min)</i> |
|---------------------------------|----------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Control (EQUIPRO®) | 804 | 18,1 ± 2,3 ^a | 0,0069 |
| POLI-CRYO (Timol 50 µM) | 723 | 16,4 ± 2,3 ^b | 0,0062 |
| POLI-CRYO (Isoespintanol 20 µM) | 723 | 15,7 ± 2,3 ^c | 0,0064 |

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (P≤0,05).

n= número de repeticiones para la medición de ROS.

20 Los resultados muestran una menor producción de ROS en semen descongelado cuando se utiliza el diluyente de la presente invención.

EJEMPLO 6

25 Se prepara un diluyente de acuerdo con el Ejemplo 4 con isoespintanol 20µM (POLY-CRYO). Una muestra de semen equino se centrifugó para retirar el plasma seminal, el precipitado fue diluido con cada diluyente hasta alcanzar una concentración aproximada de 100 millones de espermatozoides/mL y se suplementó con plasma seminal equino (10 % v/v).

Se realizó el mismo protocolo indicado en el Ejemplo 5 para la congelación del semen y se tomaron las siguientes medidas de los espermatozoides después de la descongelación: movilidad progresiva, vitalidad, integridad de la membrana plasmática y actividad mitocondrial. Los resultados, comparados con el diluyente para semen EQUIPRO®, fueron los siguientes (Tabla 5):

30 Tabla 5. Resultados de calidad e integridad del semen equino descongelado.

| <i>DILUYENTE</i> | <i>n</i> | <i>MOVILIDAD PROGRESIVA (%)</i> | <i>VITALIDAD (%)</i> | <i>INTEGRIDAD MEMBRANA (%)</i> | <i>ACTIVIDAD MITOCONDRIAL (URF)</i> |
|------------------|----------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Control EQUIPRO® | 84 | 36,4 ± 1,4 ^a | 51,8 ± 1,4 ^a | 36,53 ± 1,2 ^a | 206,3 ± 4,8 ^a |
| POLI-CRYO | 87 | 47,0 ± 1,1 ^b | 57,1 ± 0,9 ^b | 44,4 ± 1.1 ^b | 209,4 ± 4.8 ^b |

| | | | | | |
|----------------------------|--|--|--|--|--|
| (Isoespintanol 20 μ M) | | | | | |
|----------------------------|--|--|--|--|--|

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el diluyente de la invención muestra un mayor efecto protector del semen equino crioconservado en cuanto a vitalidad y movilidad después de la descongelación.

EJEMPLO 7

- 5 Se prepara un diluyente de acuerdo con el Ejemplo 4 con isoespintanol 20 μ M (POLY-CRYO). Una muestra de semen equino se centrifugó para retirar el plasma seminal, el precipitado fue diluido con cada diluyente hasta alcanzar una concentración de 100 millones de espermatozoides/mL y se suplementó con plasma seminal equino (10 % v/v).

Se hicieron mediciones después de la descongelación mediante un análisis de semen computarizado (CASA), de la movilidad total, movilidad progresiva y velocidad curvilínea (VCL) de los espermatozoides. Los resultados, comparados con dos diluyentes para semen, EQUIPRO® y GENT® fueron los siguientes (Tabla 6):

10

Tabla 6. Resultados de evaluación después de la descongelación mediante un análisis de semen computarizado (CASA).

| <i>DILUYENTE</i> | <i>n</i> | <i>MT</i> | <i>MP</i> | <i>VCL</i> |
|---|----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| EQUIPRO® | 22 | 50,9 \pm 19,4 ^b | 23,0 \pm 12,0 ^b | 67,5 \pm 11,7 ^b |
| GENT® | 26 | 42,2 \pm 15,1 ^c | 21,5 \pm 9,2 ^b | 66,4 \pm 17,8 ^b |
| POLI-CRYO (Isoespintanol 20 μ M) | 15 | 67,0 \pm 21,5 ^a | 29,2 \pm 13 ^a | 71,0 \pm 12,0 ^a |

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

Movilidad total (TM), movilidad progresiva (PM), velocidad curvilínea (VCL).

- 15 De acuerdo con los resultados, el diluyente de la presente invención mejora los parámetros de movilidad de semen crioconservado, lo cual es favorable para la conservación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

REFERENCIAS CITADAS

1. BALL B, MEDINA V, GRAVANCE C, BAUMBER J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology* 2001;56(4):577-589.

20 2. AURICH J, SCHÖNHERR U, HOPPE H, AURICH C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* 1997;48(2):185-192.

3. BAUMBER J, VO A, SABELUR K, BALL B. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2002;57:1025-1033.

4. BALL B. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci.* 2008;107(3-4):257-267.

25 5. BALL B, VO A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl.* 2001;22(6):1061-1069.

6. BAUMBER J, BALL B, LINFOR J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res.* 2005;66(5):772-779.

30 7. BARROS L, SILVA S, ALMEIDA F, SILVA E, CARNEIRO G, GUERRA M. Effect of addition of acetyl-cysteine and glutathione peroxidase in freezing extender of stallion semen. *J Equine Vet Sci.* 2012;32:475-518.

8. PAGL R, AURICH J, MÜLLER-SCHLÜSSER F, KANKOFER M, AURICH A. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology* 2006;66(5):1115-1122.

35 9. VASCONCELOS J, CHAVEIRO A, GOIS A, MOREIRA DA SILVA F. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *J Equine Vet Sci.* In press 2013.

10. WEBB G, ARNS M. Effect of pyruvate and lactate on motility of cold stored stallion spermatozoa challenged by hydrogen peroxide. *J Equine Vet Sci.* 2006;26(9):406-411.
- 5 11. MARTINS H, SOUZA M, PENNA C, DA SILVA G, CORTES S, STAHLBERG R, et al. Effects of lactoferrin supplementation to milk- and caseinate-based extenders on sperm motility, membrane integrity and nitric oxide levels of cooled stallion semen. *J Equine Vet Sci.* 2012;32:475-518.
12. LOOMIS P, GRAHAM J. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci.* 2008;105:119-128.
13. CHENIER T, MERKIES K, LEIBO S, PLANTE C, JOHNSON W. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. *AAEP Proceedings* 1998;44:5-6.
- 10 14. MANTOVANI R, ROTA A, PALOMO M, BAILONI L, VINCENTI L. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutr Dev.* 2002;42(3):217-226.
15. MEDEIROS A, GOMES G, CARMO M, PAPA F, ALVARENGA M. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 2002; 58: 273-276.
- 15 16. SQUIRES EL, KEITH SL, GRAHAM JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2004; 62: 1056-1065.
17. JANETT, F.; SACHER, K.; HASSIG, M. Y THUN, Quality of Raw and of Cold-Stored Semen in Icelandic Stallions. *Journal of Equine Veterinary Science.* 2012;32:390-395.
- 20 18. PALACIOS, A. y QUINTERO, L.Z. Efecto de la sustitución de yema de huevo por albúmina sérica bovina, suero equino o suero bovino en el diluyente de congelación sobre la viabilidad posdescongelación del espermatozoide equino. *Revista veterinaria, Mexico* 1996;27(3):221-227.
19. BOETA M, QUINTERO L. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *Revista veterinaria, Mexico* 2000;31(1):67-69.
- 25 20. BRUM A, SABELUR K, BALL B. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology* 2008;69:1041-1055.
21. LISBOA F, HARTWIG F, MAZIERO R, MONTEIRO G, PAPA F, DELL'AQUA J. Use of L-carnitine and acetyl-L-carnitine in cooled-stored stallion semen. *J Equine Vet Sci.* 2012;32:475-518.
- 30 22. RODRIGUEZ, A.M.; FERRUSOLA, C.O.; GARCIA, B.M.; MORRELL, J.M.; TAPIA, J.A. y PEÑA, J.F. Freezing stallion semen with the new Caceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability. *Animal Reproduction Science* 2011;127(1-2):78-83.
23. HUSSAIN J, SALAM A, GOHAR A. A study on the cryopreservation of stallion semen with alpha lipoic acid. *Intl R J of Pharmaceuticals* 2011;1(1):21-26.
24. MCNIVEN M, RICHARDSON G. Chilled storage of stallion semen using perfluorochemicals and antioxidants. *Cell Preservation Technology* 2002;1(3):165-174.
- 35 25. LAGOURI V, BOSKOU D. Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices. *Dev Food Sci.* 1995;37(1):869-879.
26. ARCILA-LOZANO C, LOARCA-PIÑA G, LECONA-URIBE S, GONZALES DE MEJIA E. El oregano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Arch Latinoam Nutr.* 2004;54(1):100-111.
- 40 27. AESCHBACH R, LOELIGER J, SCOTT B C, MURCIA A, BUTLER J, HALLIWELL B, et al. Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol.* 1994;32(1):31-36.
28. LAGOURI V, BLEKAS G, TSIMIDOU M, KOKKINI S, BOSKOU D. Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown in Greece. *Z Lebensmitt Unters Forsch.* 1993;197(1):20-23.
29. AL-MALKI A. Antioxidant properties of thymol and butylatedhydroxytoluene in carbon tetrachloride - induced mice liver injury. *JKAU Sci.* 2010;22(1):239-248.
- 45 30. ROJANO B, GAVIRIA C, MARITZA A, GIL A, SAEZ J, SCHINELLA G, et al. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 2008;15(1):173-181.
31. ROJANO B, SAEZ J, SCHINELLA G, QUIJANO J, VELEZ E, GIL A. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-Isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *J Mol Struct.* 2008;877(1-3):1-6.

32. ROJANO B, GAVIRIA C, SÁEZ J. Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 2008;15(2):212:218.

REIVINDICACIONES

1. Un diluyente para la conservación de semen que comprende:

a- un agente citoprotector seleccionado entre: carvacrol, isoespintanol y mezclas de los mismos;

5 b- un agente crioprotector seleccionado entre: etilenglicol, metilformamida, dimetilformamida, dietilformamida, yema de huevo y mezclas de los mismos; y

c- coadyuvantes seleccionados entre: glucosa, fructosa, sacarosa, lípidos saturados y/o insaturados, caseínas, albúminas, plasma seminal, vitamina E, vitamina C, vitamina A, sistema tampón fosfato, sistema tampón tris, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, cafeína, pentoxifilina, taurina, gentamicina, penicilina, estreptomina, anfotericina y mezclas de los mismos.

10 2. El diluyente según la reivindicación 1, en donde el agente crioprotector tiene una concentración entre 1,0 μ M y 200 μ M.

3. El diluyente según la reivindicación 1, que comprende:

| <i>COMPONENTE</i> | <i>CONCENTRACIÓN</i> |
|------------------------|----------------------|
| Leche semidescremada | 0,1 - 0,9 % p/v |
| Caseinatos de sodio | 1,0 - 5,0 % p/v |
| Sacarosa | 1,0 - 5,0 % p/v |
| Fructosa | 0,1 - 1,0 % p/v |
| Glucosa | 1,0 - 5,0 % p/v |
| Sulfato de Gentamicina | 0,02 - 0,20 % p/v |
| Isoespintanol | 1,0 - 200 μ M |
| Yema de huevo | 1,0 - 10,0 % p/v |
| Dimetilformamida | 1,0 - 10,0 % p/v |
| Plasma seminal equino | 1,0 - 30,0 % p/v |

4. El diluyente según la reivindicación 1, que comprende:

| <i>COMPONENTE</i> | <i>CONCENTRACIÓN</i> |
|------------------------|----------------------|
| Leche semidescremada | 0,1 - 0,9 % p/v |
| Caseinatos de sodio | 1,0 - 5,0 % p/v |
| Sacarosa | 1,0 - 5,0 % p/v |
| Fructosa | 0,1 - 1,0 % p/v |
| Glucosa | 1,0 - 5,0 % p/v |
| Sulfato de Gentamicina | 0,02 - 0,20 % p/v |
| Carvacrol | 1,0 - 200 μ M |
| Yema de huevo | 1,0 - 10,0 % p/v |
| Dimetilformamida | 1,0 - 10,0 % p/v |

ES 2 787 200 T3

| | |
|-----------------------|----------------|
| Plasma seminal equino | 1,0 – 30 % p/v |
|-----------------------|----------------|

5. El diluyente según la reivindicación 1, que comprende:

| <i>COMPONENTE</i> | <i>CONCENTRACIÓN</i> |
|--------------------------|----------------------|
| Leche semidescremada | 0,28 % p/v |
| Caseinatos de sodio | 1,57 % p/v |
| Sacarosa | 2,58 % p/v |
| Fructosa | 0,47 % p/v |
| Glucosa | 2,03 % p/v |
| Sulfato de Gentamicina | 0,10 % p/v |
| Isoespintanol | 20,0 μ M |
| Yema de huevo de gallina | 2 % v/v |
| Dimetilformamida | 5,0 % v/v |
| Agua ultrapura | c.s.p. 100 mL |