



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712825-8 A2**

(22) Data de Depósito: 12/06/2007
(43) Data da Publicação: 24/07/2012
(RPI 2168)



(51) *Int.Cl.:*
A01N 1/02

(54) **Título:** MEMBRANA CRIOPROTETORA DE ESPERMA

(30) **Prioridade Unionista:** 12/06/2006 US 60/812.833, 29/08/2006 US 60/840.744, 25/10/2006 US 60/854.501, 25/10/2006 US 60/854.501, 25/10/2006 US 60/854.501, 29/08/2006 US 60/840.744

(73) **Titular(es):** The Jackson Laboratory

(72) **Inventor(es):** G. Charles Ostermeier, Jane S. Farley, Michael V. Wiles, Robert Taft

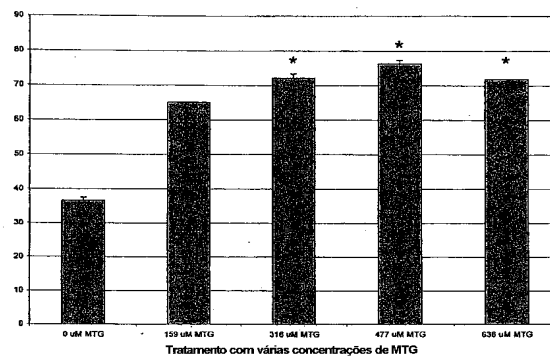
(74) **Procurador(es):** NELLIE ANNE DAIEL-SHORES

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007013884 de 12/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/146344de 21/12/2007

(57) **Resumo:** MEMBRANA CRIOPROTETORA DE ESPERMA. São descritas composições que compreendem um crioprotetor; uma membrana protetora que estabiliza ou auxilia na estabilização de membranas do esperma; e um varredor de radical livre (por exemplo, um agente redutor, um antioxidante).

Monotoglicerol aumenta a fertilidade de esperma C57BL/6J.



Legenda para o eixo x: Concentração do tratamento MTG

Legenda para o eixo y: % de óocitos em desenvolvimento em embriões de 2 células

“MEMBRANA CRIOPROTETORA DE ESPERMA”

REFERÊNCIA CRUZADA A APLICAÇÕES RELACIONADAS

Esta solicitação reivindica o benefício da data de depósito da solicitação provisória americana número 60/812.833, depositada em 12 de junho de 2006, intitulada (meio crioprotetor de espermatozóides”, por Ostermeier et al., solicitação provisória americana número 60/840.744, depositada em 29 de agosto de 2006, intitulada "Meio crioprotetor de espermatozóides", por Ostermeier et al, e solicitação provisória americana número 160/854.501, depositada em 25 de outubro de 2006, intitulada "Meio crioprotetor de espermatozóides", por Ostereimer et al. Os ensinamentos das referidas solicitações são incorporados aqui como referência na sua integridade.

DECLARAÇÃO RELATIVA À PESQUISA OU DESENVOLVIMENTO COM APOIO FEDERAL

Esta invenção foi feita com o apoio do Governo de acordo com o número de concessão RR01262-24, concedido pelo "National Institute of Health". O governo tem certos direitos na invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os avanços revolucionários na pesquisa do genoma e na habilidade de criação de famílias geneticamente específicas de camundongos, resultou em um aumento exponencial no número de famílias de camundongos disponíveis para a pesquisa biomédica. Estas famílias criadas recentemente, especialmente aquelas nas quais a família ou mutação pode ser mantida pelo plasma de germe haploide, são conservadas muito eficientemente através do congelamento e estocagem de esperma. Os métodos utilizados atualmente para a criopreservação de esperma de ratos apresentam sucesso invariavelmente moderado, são dependentes da constituição genética do macho e têm sido, portanto, em geral, considerados inadequados para a conservação segura da maioria das famílias de ratos de criação. São requeridos métodos adicionais para a criopreservação de esperma, que são muito menos afetados adversamente pelos antecedentes genéticos.

RESUMO DA INVENÇÃO

O meio crioprotetor e os métodos da invenção atual, que incluem métodos de conservação criogênica de esperma (por exemplo, de mamíferos, incluindo mamíferos humanos e não humanos, tais como roedores, incluindo esperma de camundongos e ratos) são de grande interesse porque eles aumentam consistentemente as taxas de sucesso obtidas com o esperma criopreservado.

Conforme utilizado aqui, o termo esperma refere-se a esperma e espermatozóides. O meio de criopreservação (também referido como meio crioprotetor) da invenção é composto, em uma realização, de um crioprotetor (também referido como um agente crioprotetor); um protetor de membrana, que estabiliza ou auxilia a estabilização de

membranas do esperma; e um removedor de radical livre (por exemplo, um agente de redução, um antioxidante). Este meio de crioproteção é referido aqui como CPM.

Em uma realização alternativa, o meio de crioproteção inclui dois dos componentes listados acima: um crioprotetor (CP) e um removedor de radical livre (FRS).

5 Este meio de crioproteção é referido como CP-FRS.

Em uma outra realização, o meio de crioproteção inclui um removedor de radical livre. Este meio de crioproteção é referido como FRS.

Conforme utilizado aqui, o termo "um" inclui ou refere-se a " pelo menos um" e também a "um ou mais". Em todas as realizações, podem ser incluídas substâncias
10 adicionais (como por exemplo, um solvente ou líquido, como a água ou uma solução fisiológica tampão; um agente anti-bacteriano; um antibiótico; um agente anti-viral, se necessário.

Em realizações específicas, tais como aquelas nas quais o esperma do roedor (por exemplo, o camundongo, rato) bovino ou humano são criopreservados, o meio de criopreservação (CPM) usado é composto de (pelo menos um; um ou mais) um e crioprotetor,
15 como um açúcar; um (pelo menos um ou mais) protetor de membrana, e um removedor de radical livre (por exemplo, um ou mais) como um agente de redução, como monotioglicerol (MTG) e/ou um antioxidante, como glutathione reduzida (GSH). Em realizações específicas, o açúcar é um trissacarídeo, como rafinose, ou um dissacarídeo, como lactose. Em
20 realizações adicionais, o crioprotetor é o glicerol ou propileno glicol, o qual pode ser usado sozinho ou em combinação um com o outro (glicerol/propileno glicol em conjunto) ou em combinação com rafinose e/ou lactose (por exemplo, rafinose e/ou lactose em combinação com glicerol e/ou propileno glicol). Em realizações específicas, o protetor de membrana é uma proteína, uma não proteína e uma combinação de proteína e uma não proteína. Em
25 realizações específicas, o protetor de membrana é leite, leite desnatado, gema de ovo ou um componente de/em/derivado de qualquer dos mencionados anteriormente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra que o monotioglicerol aumenta a fertilidade do esperma C57BL/6J.

A figura 2 ilustra que o GSH aumenta a fertilidade do esperma criopreservado
30 C57BL/6J.

A figura 3 ilustra que o MTG reduz o ROS em esperma criopreservado, tanto dos C57BL/6J(B6) como dos BALB/cByJ (BALB/cBy) de camundongos.

A figura 4 ilustra um aumento da capacidade de fertilização de esperma após a criopreservação.

35 As figuras 5A - 5H demonstram que a presença do monotio- glicerol (MTG) durante a criopreservação do esperma bovino aumenta a viabilidade após o descongelamento. O esperma de três coleções de cada um de seis touros diferentes foram congelados na

presença de MTG nas concentrações indicadas nos eixos x. Para cada coleção, dois conjuntos de cada três amostras foram criadas e analisadas duas vezes em relação à viabilidade do esperma. As diferenças na viabilidade da célula do esperma entre os tratamentos foi determinada utilizando-se análise de variação das percentagens transformadas em aresina e as comparações planejadas previamente com o controle do método de Dunnett que não utiliza MTG. O painel A ilustra os erros médios e standard para os seis touros enquanto que os painéis B a H ilustram a percentagem de esperma viável para os indivíduos. Foi notada uma influência no tratamento geral onde haviam diferenças entre aqueles touros mostrados nos painéis B, C, e D.

A figura 6 compara o monotioglicerol congelado contra o fresco e os seus efeitos na taxa de fertilização.

As figura 7A e 7B mostram os resultados das avaliações executadas para a identificação de removedores adequados de radical livre.

A figura 8 mostra os resultados do trabalho no qual o esperma de C57BL/6J foi congelado em 18% de rafinose suplementada com 477 microM de monotioglicerol. O esperma foi descongelado e utilizado para a fertilização in vitro utilizando oócitos de fêmeas C57BL/6J super-ovuladas. Com esta técnica foi obtido um esperma viável e foram fertilizados 30% dos oócitos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

É descrita aqui uma composição, referida como meio crio- protetor ou meio de crioproteção, útil para a crio- conservação de esperma de uma ampla variedade de mamíferos e não mamíferos. Em uma realização, o meio crioprotetor é referido como CPM e é composto de um crio- protetor; um protetor de membrana que estabiliza ou auxilia a estabilização de membranas de esperma; e um removedor de radical livre (por exemplo, um agente redutor, um antioxidante). Conforme utilizado aqui, com referência a CPM ,CP-FRS e FRS (todos os tipos de meio crioprotetor descritos aqui), o termo "removedor de radical livre" refere-se a uma substância ou agente que remove ou inativa radicais livres, tais como uma substância ou agente adicionado em uma mistura para remover ou inativar radicais livres. Conforme usado aqui, com referência a CPM, CP-FRS e FRS (todos os tipos de meio crioprotetor descritos aqui), o termo "agente de redução" refere-se a um elemento ou um composto o qual, em uma reação redox (redução-oxidação), reduz a outra espécie (elemento ou composto). Conforme usado aqui, com referência a CPM, CP-FRS e FRS (todos os tipos de meio crioprotetor descritos aqui), o termo "antioxidante" refere-se a uma substância ou agente que reduz os danos oxidativos nas células e biomoléculas. A composição, tipicamente adicionalmente é composta de água em quantidade suficiente para manter a funcionalidade do esperma. Alternativamente, pode ser usado um líquido ou solvente diferente de água, como solução salina, ou uma solução tampão fisiológica, como

fosfato (PBS), bicarbonato, HEPES, MOPS, CHES, MES, CAPS ou Tris, sózinhos ou em combinação com água.

Em outra realização, o meio crioprotetor inclui um crioprotetor e um removedor de radical livre e não inclui um protetor de membrana. O meio crioprotetor, referido aqui como CP-FRS, é útil para a criopreservação de esperma de uma ampla variedade de mamíferos e não mamíferos. Em uma outra realização, o meio crioprotetor inclui um removedor de radical livre, e não inclui um crioprotetor ou um protetor de membrana. Nestas realizações, a composição, tipicamente adicionalmente é composta de água em quantidade suficiente para manter a funcionalidade do esperma, assim como de componentes adicionais, conforme descrito aqui.

A composição pode ser usada para a criopreservação de esperma, incluindo esperma de mamíferos, tais como roedores (por exemplo, camundongos, ratos), bovino, canino, felino, suíno, de gansos, ovelhas, coelhos, cavalos, de camelo, esperma de animais mamíferos domésticos ou de companhia e esperma humano, assim como esperma de aves (por exemplo, galinha, peru, ave doméstica ou de companhia, e esperma de peixe (aqueles peixes produzidos para consumo, ou de companhia)). O meio crioprotetor é útil para a criopreservação do esperma obtido de vertebrados de todos os tipos, tais como mamíferos, incluindo os vertebrados modificados geneticamente de todos os tipos, incluindo mamíferos geneticamente modificados (por exemplo, esperma obtido de roedores geneticamente modificados (por exemplo, camundongos, ratos), bovino, canino, felino, suíno, de gansos, ovelhas, coelhos, cavalos, camelos, outros mamíferos domésticos ou de companhia), assim como não mamíferos geneticamente modificados (tais como esperma obtido de pássaros geneticamente modificados (por exemplo, galinha, peru, pássaro de companhia) e peixes (aqueles produzidos para consumo, peixes de companhia)). A composição descrita aqui pode ser usada em qualquer método para a conservação criogênica de esperma.

Em uma realização, o método de conservação criogênica de esperma (produção de esperma conservado criogenicamente) é composto de (a) combinação do esperma a ser conservado criogenicamente e uma composição que é composta pelo menos de um dos: (1) um crioprotetor; (2) um protetor de membrana que estabiliza ou auxilia a estabilização de membranas do esperma; e (3) um removedor de radical livre (como um agente de redução ou um antioxidante), para a produção de uma combinação (combinação de meio crioprotetor-esperma, também referido como combinação inicial ou combinação a ser criopreservada) e (b) submeter-se a combinação a condições que resultam na criopreservação do esperma na combinação, dessa forma produzindo uma combinação conservada criogenicamente que é composta de esperma conservado criogenicamente.

Em uma realização específica, o método de conservação criogênica de esperma (produção de esperma conservado criogenicamente) é composto de (a) combinação do

esperma a ser conservado criogenicamente e de uma composição, referida como CPM, que é composta de: (1) um crioprotetor; (2) um protetor de membrana que estabiliza ou auxilia a estabilização de membranas de esperma; e (3) um removedor de radical livre (como um agente de redução ou um antioxidante), para produzir uma combinação (combinação de meio crioprotetor-esperma, também referido como combinação inicial ou combinação a ser crio- conservada) e (b) submeter se a combinação a condições que resultam na crioconservação de esperma na combinação, dessa forma produzindo uma combinação conservada criogenicamente que é composta de esperma conservado criogênicamente.

A combinação inicial (a combinação a ser crioconservada) é produzida antes da crioconservação e pode ser submetida a condições que resultam na crioconservação de esperma na combinação imediatamente após a produção ou dentro de um período limitado após ter sido produzido. A crioconservação pode ser executada a qualquer tempo após a produção que não afete adversamente a viabilidade do esperma, como por exemplo, para esperma de camundongos, a qualquer tempo dentro de cerca de 90 minutos após ele ter sido produzido. O esperma resultante é esperma crioconservado que apresenta um potencial de fertilização consistentemente melhor do que o potencial de fertilização do esperma crioconservado obtido utilizando-se os métodos e meios atualmente disponíveis.

A conservação pode ser executada em uma temperatura de cerca de mais 4 °C até cerca de menos 200 °C. Em realizações específicas, a crioconservação é executada em uma temperatura entre cerca de menos 80 °C até cerca de menos 200 °C. Em todas as realizações descritas aqui, o esperma crioconservado resultante pode ser estocado indefinidamente em uma temperatura apropriada, conhecida por aqueles adestrados na arte (por exemplo, em temperaturas que variam de cerca de menos 80 °C a cerca de menos 200 °C).

A capacidade de fertilização ou habilidade do esperma pode ser avaliada utilizando-se métodos conhecidos por aqueles adestrados na arte, tais como por um método in vitro (por exemplo, através da avaliação da habilidade para fertilizar oócitos com os quais ele são combinados/incubados (a sua habilidade para formar, por exemplo, embriões com duas células)) e/ou através de um método in vivo (por exemplo, através da avaliação da produção de descendentes pelas fêmeas nas quais foram implantados os oócitos fertilizados). O método pode ser usado para conservar criogênicamente o esperma obtido de vertebrados, incluindo mamíferos e não mamíferos, de todos os tipos, incluindo esperma obtido de vertebrados modificados geneticamente (por exemplo, mamíferos modificados geneticamente, tais como roedores modificados geneticamente (por exemplo, camundongos, ratos), bovino, canino, felino, suíno, de gansos, ovelhas, coelhos, cavalos, camelos, mamíferos domésticos ou de companhia) e não mamíferos modificados geneticamente (tais como pássaros modificados geneticamente (por exemplo, galinhas,

perus, pássaros de companhia) e peixe (aqueles produzidos para consumo, peixes de companhia). Fazer referência à tabela 1, que é uma lista de animais para os quais pode ser usada a invenção atual.

Em certas realizações, o método de conservação criogênica de esperma é composto de: (a) combinação do esperma a ser conservado criogênicamente e uma composição que é composta de (1) um crioprotetor, como um ou mais açúcares (por exemplo, rafinose, lactose), glicerol e/ou propileno glicol; (2) um protetor de membrana, que é uma macromolécula ou mistura de macromoléculas que estabiliza ou auxilia a estabilização de membranas do esperma (por exemplo, leite ou pó de leite, como leite desnatado ou pó de leite desnatado; uma proteína no leite; uma proteína do leite ou componente do mesmo); e (3) um removedor de radical livre, como um agente de redução ou um antioxidante (por exemplo, monotioglicerol, glutathione reduzida (GSH)), para produzir uma combinação (combinação de meio crioprotetor-esperma); e (b) submeter-se a combinação a condições que resultam na crioconservação de esperma na combinação, dessa forma produzindo uma combinação crio- conservada que é composta de esperma crioconservado.

A macromolécula usada pode ser qualquer macromolécula descrita aqui ou qualquer outra macromolécula que tenha as características desejadas. A combinação inicial (a combinação a ser crioconservada) é produzida antes da crio- conservação e pode ser submetida a condições que resultam na crioconservação de esperma na combinação imediatamente após ele ser produzido ou dentro de um período limitado após ele ser produzido. A crioconservação pode ser executada a qualquer tempo após a produção que não afete adversamente significativamente a viabilidade do esperma. Por exemplo, com o esperma de camundongos ou ratos, a crioconservação pode ser executada a qualquer tempo dentro de cerca de 90 minutos após ele ser produzido. Como um exemplo adicional, a crioconservação de esperma humano ou bovino pode ser feita em até cerca de 24h após a produção da combinação. A conservação é executada em uma temperatura de cerca de mais 4 °C até cerca de menos 200 °C. Em realizações específicas, a crioconservação é executada em uma temperatura entre cerca de menos 80 °C a cerca de menos 200 °C. Antes do esperma ser incubado, o esperma é descongelado e poderá também ser lavado. Em todas as realizações descritas aqui, o esperma crio- conservado resultante pode ser estocado indefinidamente. O esperma resultante é o esperma crioconservado que apresenta um potencial de fertilização consistentemente melhor do que o potencial de fertilização do esperma crio- conservado obtido utilizando-se os métodos e meios atualmente disponíveis.

A capacidade de fertilização ou habilidade do esperma pode ser avaliada utilizando-se métodos conhecidos por aqueles adestrados na arte, tais como in vitro, através da avaliação da habilidade para fertilizar oócitos com os quais ele são combinados/incubados (a sua habilidade para formar, por exemplo, embriões de duas células) e/ou in vivo,

avaliando-se a produção de descendentes pelas fêmeas nas quais os oócitos fertilizados são implantados. No caso de esperma humano, a capacidade ou a habilidade de fertilização pode ser avaliada utilizando-se métodos disponíveis, tais como um ensaio funcional, incluindo, mas não limitado a, ensaio de mobilidade, um ensaio de viabilidade, um ensaio de "hemizona" (ligação do esperma com a zona pelúcida) ou penetração do esperma na zona de oócitos de hamster livres da zona.

Em uma realização específica, o método da conservação criogênica de esperma é composto de: (a) combinação do esperma a ser conservado criogenicamente e de uma composição que é composta de (1) um crioprotetor, que é um ou mais açúcares (por exemplo, rafinose, lactose); (2) um protetor de membrana, que é uma macromolécula, como uma proteína (por exemplo, leite ou uma proteína contida no leite; leite desnatado ou uma proteína contida no leite desnatado, gema de ovo ou uma proteína contida na gema de ovo) e que estabiliza ou auxilia a estabilização de membranas do esperma; e (3) um removedor de radical livre, como um agente de redução, ou um antioxidante (por exemplo, monoglicérol, glutathione reduzida (GSH)), para produzir uma combinação (combinação de meio crioprotetor-esperma); e (b) submeter-se a combinação a condições que resultam na crioconservação do esperma na combinação, dessa forma produzindo uma combinação crioconservada que é composta de esperma crioconservado. A combinação inicial (combinação a ser crioconservada) é produzida antes da crioconservação e pode ser submetida a condições que resultam na crioconservação de esperma na combinação imediatamente após ele ser produzido ou dentro de um período limitado após ele ser produzido. A crioconservação pode ser executada a qualquer tempo após a produção que não afete significativamente adversamente a viabilidade do esperma. Por exemplo, com esperma de camundongos, a crioconservação pode ser executada a qualquer tempo dentro de cerca de 90 minutos após ele ser produzido. A conservação é executada, por exemplo, em uma temperatura de cerca de mais 4 °C a cerca de menos 200 °C. Em realizações específicas, a crioconservação é executada em uma temperatura entre cerca de menos 80 °C a cerca de menos 200 °C. Em todas as realizações descritas aqui, o esperma crioconservado resultante pode ser estocado indefinidamente. O esperma resultante é o esperma crioconservado que apresenta um potencial de fertilização consistentemente melhor do que o potencial de fertilização do esperma crioconservado obtido utilizando-se os métodos e meios atualmente disponíveis. A capacidade de fertilização ou funcionalidade do esperma pode ser avaliada utilizando-se métodos conhecidos por aqueles adestrados na arte, tais como in vitro, através da avaliação da habilidade de fertilização dos oócitos com os quais ele são combinados/incubados (a sua habilidade para formar embriões de duas células, por exemplo) e/ou in vivo, através da avaliação da produção de descendência por fêmeas nas quais os oócitos são implantados. No caso de esperma humano, a capacidade

ou habilidade de fertilização pode ser avaliada utilizando-se métodos disponíveis, tais como um ensaio funcional, incluindo, mas não limitados a, um ensaio de hemizona (ligação do esperma na zona pelúcida) ou penetração do esperma nos oócitos de hamster livres de zona.

5 Em uma realização alternativa, o meio crioprotetor inclui um (pelo menos um; um ou mais) crioprotetor e um (pelo menos um; um ou mais) removedor de radical livre e não inclui um protetor de membrana. Este meio crioprotetor, referido aqui como CP-FRS, é útil para as mesmas finalidades e nos métodos conforme descrito aqui para CPM.

10 Em uma realização, o método de conservar criogenicamente o esperma (produzindo esperma conservado criogenicamente) é composto de (a) combinação do esperma a ser conservado criogenicamente e uma composição que inclui um crioprotetor e um removedor de radical livre (como um agente de redução ou um antioxidante), para produzir uma combinação (combinação de esperma-meio crioprotetor ou esperma-FRS) e (b) submeter-e a combinação a condições que resultam na crioconservação do esperma na combinação,
15 dessa forma produzindo uma combinação conservada criogenicamente que é composta de esperma conservado criogênicamente.

 Em uma realização específica, o método de conservar criogenicamente esperma (produção de esperma conservado criogenicamente) é composto de (a) combinação do esperma a ser conservado criogenicamente e uma composição, referida como CP-FRS, que
20 inclui um crioprotetor e um removedor de radical livre (como um agente redutor ou um antioxidante), para produzir uma combinação (combinação de meio crio protetor-esperma, também referido como a combinação inicial ou a combinação a ser crioconservada) e (b) submeter-se a combinação a condições que resultam na crioconservação de esperma na combinação, dessa forma produzindo uma combinação conservada criogenicamente que é
25 composta de esperma conservado criogenicamente.

 A combinação inicial (a combinação a ser crioconservada) é produzida antes da crioconservação e pode ser submetida a condições que resultam na crioconservação de esperma na combinação, imediatamente após a produção ou dentro de um período limitado após ele ser produzido. A crioconservação pode ser executada a qualquer tempo após a
30 produção que não afete adversamente a viabilidade do esperma, como por exemplo, para esperma de camundongos, a qualquer tempo dentro de cerca de 90 minutos após ele ser produzido. O esperma resultante é esperma crioconservado que apresenta um potencial de fertilização consistentemente melhor do que o potencial de fertilização do esperma crioconservado obtido utilizando-se os métodos e meios disponíveis atualmente.

35 A conservação pode ser executada em uma temperatura de cerca de mais 4 °C a cerca de menos 200 °C. Em realizações específicas, a crioconservação é executada em uma temperatura entre cerca de menos 80 °C a cerca de menos 200 °C. Em todas as

realizações descritas aqui, o espermatozoide criopreservado resultante pode ser estocado indefinidamente em uma temperatura apropriada, conhecida por aqueles adestrados na arte (por exemplo, em temperaturas que variam de cerca de menos 80 °C a cerca de menos 200 °C).

5 Os crioprotetores e os removedores de radical livre descritos aqui são úteis na composição CP-FRS e nos métodos nos quais o CP-FRS é utilizado. Em uma outra realização, o meio de criopreservação inclui um (pelo menos um, um ou mais) removedor de radical livre e não inclui um crioprotetor ou um protetor de membrana. Em uma realização, o método de conservar criogenicamente espermatozoide (a produção de espermatozoide conservado criogenicamente) é composto de (a) combinação do espermatozoide a ser conservado criogenicamente e de uma composição que inclui um removedor de radical livre (como um agente redutor ou um antioxidante) para produzir uma combinação (combinação de meio crioprotetor-espermatozoide ou FRS-espermatozoide, também referido como a combinação inicial ou a combinação a ser criopreservada) e (b) submeter-se a condições que resultam na criopreservação de espermatozoide na combinação, dessa forma produzindo uma combinação conservada criogenicamente que é composta de espermatozoide conservado criogenicamente.

Em uma realização específica, o método de conservar criogenicamente espermatozoide (produção de espermatozoide conservado criogenicamente) é composto de (a) combinação do espermatozoide a ser conservado criogenicamente e uma composição, referida como FRS, que inclui um removedor de radical livre (como um agente redutor ou um antioxidante), para produzir uma combinação (a combinação de meio crioprotetor-espermatozoide, também referido como combinação inicial ou a combinação a ser criopreservada) e (b) submeter-se a condições que resultam na criopreservação de espermatozoide na combinação, dessa forma produzindo uma combinação conservada criogenicamente que é composta de espermatozoide conservado criogenicamente. A combinação inicial (a combinação a ser criopreservada) é produzida antes da criopreservação e pode ser submetida a condições que resultam na criopreservação de espermatozoide na combinação imediatamente após a produção ou dentro de um período limitado após ele ser produzido. A criopreservação pode ser executada a qualquer tempo após a produção que não afete adversamente a viabilidade do espermatozoide, como por exemplo, para espermatozoide de camundongos, a qualquer tempo dentro de cerca de 90 minutos após ele ser produzido. O espermatozoide resultante é espermatozoide criopreservado que apresenta um potencial de fertilização consistentemente melhor do que o potencial de fertilização do espermatozoide criopreservado obtido utilizando-se os métodos e meios atualmente disponíveis. A conservação pode ser executada em uma temperatura de cerca de mais 4 °C a cerca de menos 200 °C. Em realizações específicas, a criopreservação é executada em uma temperatura entre cerca de menos 80 °C a cerca de

menos 200 °C. Os removedores de radical livre descritos aqui são úteis na composição FRS e nos métodos nos quais o FRS é utilizado.

Em todas as realizações descritas aqui, o esperma resultante criopreservado pode ser conservado indefinidamente em uma temperatura apropriada, conhecida por aqueles adestrados na arte (por exemplo, em temperaturas que variam de cerca de menos 80 °C a cerca de menos 200 °C). Em todas as realizações, o meio crioprotetor pode ser composto de componentes adicionais, tais como água ou outro solvente, um agente anti-bacteriano, um agente anti-viral, e/ou um antibiótico.

Conforme usado aqui, "um" inclui " pelo menos um" e "um ou mais".

Em certas realizações, o método da invenção atual é um método de produção de descendentes vivos, que podem ser vertebrados de vários tipos, incluindo mamíferos e não mamíferos. Ele é um método de produção de descendentes vivos, tais como roedores (por exemplo, camundongos, ratos) gado bovino (vacas, touros), cachorros, gatos, porcos/suínos, gansos, ovelhas, cavalos, camelos, coelhos, mamíferos de animais domésticos ou de companhia, pássaros (por exemplo, galinhas, perus, peixes domésticos ou de companhia (aqueles produzidos para consumo, peixes de companhia) outras espécies (incluindo espécies correndo risco de extermínio) e humanos. O método de produção de descendentes vivos é composto das etapas descritas acima para conservar criogenicamente o esperma e além disso é composto do descongelamento do esperma criopreservado resultante (dessa forma produzindo esperma descongelado);

a introdução de esperma descongelado ou de oócitos fertilizados produzidos utilizando-se o esperma descongelado resultante do método descrito acima em uma fêmea apropriada (por exemplo, uma fêmea pseudo-grávida, como um camundongo-fêmea pseudo-grávida, quando são utilizados oócitos fertilizados e uma fêmea receptiva que está no período fértil, quando é usado esperma descongelado) e mantendo-se a fêmea na qual os oócitos ou esperma foram introduzidos em condições apropriadas para o crescimento e o desenvolvimento dos oócitos fertilizados em prole viva (apropriado para a produção de prole viva), através do que é/são produzidos descendentes vivos. Naquelas realizações nas quais o esperma descongelado é introduzido em uma fêmea apropriada, eles estão presentes em um meio apropriado, como o meio CPM ou IVF. Por exemplo, a combinação de meio crioprotetor/esperma descongelado não é diluída ou é diluída em um meio apropriado IVF (por exemplo, Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Austrália; Queensland, Australia; (Quinn et al., 1995)) e introduzido-se em uma fêmea receptiva adequada. Ou o esperma pode ser introduzidos através de inseminação artificial auxiliada por cirurgia (AI). Por exemplo, a suspensão de esperma é transferida por meio de uma pipeta de transferência diretamente para dentro de um espaço entre o ovário e o invólucro do ovário próximo do infundíbulo do cano de transplante. Alternativamente, o esperma pode ser inserido na região da âmbula

através da parede do canal do oviduto de uma fêmea receptiva apropriada, como uma fêmea superovulada, ver (Sato and Kimura, 2001; Sato et al., 2004). Alternativamente, a combinação do meio crioprotetor/esperma descongelado é diluído em um meio IVF apropriado (por exemplo, Cooks Mouse Vitro Fert Cook Australia; Queensland, Australia; (Quinn et al., 1995)) e posteriormente é misturado com massas de ovo ou oócitos e é cultivado in vitro nos embriões do estágio com duas células ou com quatro células para o estágio de 16 células do ovo fertilizado, do estágio morula ou blastocisto. Posteriormente os embriões do estágio de 2 células ,uu 4 células para o estágio de 16 células, os embriões do estágio mórula ou blastocisto de ovos fertilizados são introduzidos em uma fêmea receptiva apropriada.

Os objetivos desta invenção são também combinações de meio crioprotetor-esperma; esperma conservado criogenicamente; e oócitos fertilizados, embriões de duas células e zigotos produzidos pelos métodos descritos.

O objetivo desta invenção é também a produção de prole viva não humana pelos métodos descritos. Em realizações específicas, a prole viva são roedores (por exemplo, camundongos, ratos), vacas, cachorros, gatos, porcos/suínos, gansos, ovelhas, cavalos, camelos, coelhos, outros mamíferos de companhia, pássaros (por exemplo, galinhas, perus, pássaros de companhia), peixes (aqueles produzidos para consumo, peixes de companhia), e outras espécies (incluindo espécies com risco de extermínio).

Componentes do meio crioprotetor

Crioprotetor

O meio crioprotetor pode ser variado nos seus componentes específicos. Por exemplo, o crioprotetor (também referido como agente crioprotetor) tipicamente é um crioprotetor não penetrante (pelo menos um, um ou mais crioprotetores não penetrantes).

Um crioprotetor penetrante (pelo menos um, um ou mais crioprotetores) também podem ser utilizados. Pode ser utilizada uma combinação de um ou mais crioprotetores não penetrantes e um ou mais crioprotetores penetrantes.

Um crioprotetor não penetrante é um soluto (agente/composto) que é incapaz de se movimentar ao longo de uma membrana de célula (aqui, a membrana do esperma) até qualquer extensão significativa/substancial. Como um componente da suspensão da célula, ele altera a natureza e/ou a extensão das alterações que ocorrem dentro do esperma e no meio crioprotetor para melhorar ou aumentar o número (percentual) de células (esperma) que sobrevivem à criopreservação. Os crioprotetores não penetrantes úteis na invenção atual podem ser um açúcar ou diferente de açúcar ou uma combinação de um ou mais açúcares e um ou mais diferentes de açúcar. Em realizações específicas, este componente do meio crioprotetor é um açúcar ou uma combinação de dois ou mais açúcares. Os açúcares incluídos no meio crioprotetor podem ser um dissacarídeo (treralose, melibiose,

sacarose, lactose), um trissacarídeo (por exemplo, rafinose, melezitose), um tetra-sacarídeo (por exemplo, estaquiase), um oligossacarídeo (manotriose), ou um polissacarídeo (por exemplo, dextrano, hidróxi-etil amido (HES)) e álcoois de açúcar dos mesmos (por exemplo, maltitol, lactitol). Em realizações específicas, o açúcar incluído no meio crioprotetor é rafinose ou lactose. Não açúcares, tais como polivinilpirrolidona (PVP), óxido de polietileno (PEO) ou polietileno glicol (PEG), podem ser incluídos no meio crioprotetor. Por exemplo, pode ser utilizado PEG de alto peso molecular, como PEG de qualquer peso molecular médio de PEG 400 a PEG 20.000 Dalton (PEG 400 a PEG 20.000). Alternativamente, pode ser usado um crioprotetor penetrante. Um crioprotetor penetrante é um soluto (agente/composto) ou um solvente que pode se movimentar ao longo de uma membrana de célula, como a membrana do esperma. Este componente altera a natureza e/ou a extensão das alterações que ocorrem tanto dentro do esperma como no meio crioprotetor para melhorar ou aumentar a percentagem (número) de células (esperma) e que sobrevivem à criopreservação.

Em realizações específicas, este componente do meio crioprotetor é um ou mais dos seguintes: um álcool de açúcar penetrante, como glicerol; dimetil-sulfóxido (DMSO); um álcool (como etileno glicol ou propileno glicol, ou uma combinação de glicerol e propileno glicol. Uma combinação de um ou mais crioprotetores não penetrantes ou um ou mais crioprotetores penetrantes também podem ser utilizados. Deve ser entendido que alguns componentes, como glicerol, atuam como crioprotetores penetrantes ou não penetrantes, dependendo das condições nas quais ele são usados. O glicerol é um álcool de açúcar que é penetrante na temperatura ambiente até a do corpo e é não penetrante em temperaturas abaixo de 0 °C. Nas temperaturas ambientes, o glicerol é um crioprotetor penetrante.

Protetor de membrana

O componente protetor de membrana do meio crioprotetor pode ser qualquer de uma larga variedade de macromoléculas que atuam como uma solução tampão e diluente para estabilizar ou auxiliar a estabilização de membranas de células. O componente protetor de membrana pode ser uma (uma ou mais, pelo menos uma) proteína, uma (uma ou mais, pelo menos uma) não proteína ou uma combinação de uma proteína ou proteínas e uma não proteína ou não proteínas. Uma ou mais proteínas podem estar presentes em/derivadas de fontes animais (proteínas animais) e podem ser, por exemplo, leite, e derivados ou componentes de leite, tais como proteína de leite, leite desnatado (como leite desnatado líquido ou pó de leite desnatado), uma proteína no leite (por exemplo, em leite integral, leite desnatado) ou um componente de uma proteína de leite; caseína, ovo, gema de ovo, clara de ovo (por exemplo, ovo fresco, gema de ovo ou clara de ovo, como ovo fresco, gema de ovo ou clara de ovo de galinha) uma proteína no ovo, gema de ovo ou clara de ovo; colágeno, elastina, gelatina, atelocolágeno, fibronectina, peptonas, queratina, albumina ou

qualquer combinação dos mesmos. Alternativamente, uma ou mais proteínas podem ser derivadas de fontes de plantas (proteínas de plantas) e podem ser, por exemplo, proteína de soja, proteína de trigo, proteína de milho, leite de coco, extrato de alovera, extrato de jojoba, ou qualquer combinação dos mesmos. O protetor de membrana pode ser uma combinação

5 de uma ou mais proteínas animais e uma ou mais proteínas de plantas. Uma ou mais proteínas podem ser uma proteína produzida recombinantemente, como caseína, colágeno, gelatina, fibronectina, albumina, lactalbumina, lactoglobulina, queratina ou qualquer combinação dos mesmos. Alternativamente, o protetor de membrana pode ser um lipídio (por exemplo, um lipídio animal, lipídio de planta, quimicamente sintetizado), lipídios

10 sintéticos, tais como fosfatidil glicerol, ácido fosfatídico, 1,1',2, 2'- tetra-acil-cardiolipina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidil- etanolamina, lipídios com base em polioxietileno, ácidos graxos araquidônicos linoleicos, linolenicos, mirístico, oleico, palmítico ou esteárico, colesterol, Pluronic F-68 ou qualquer combinação dos mesmos, podem ser utilizados (por exemplo, conforme o suprimento de concentrados de lipídios quimicamente definidos pela

15 Invitrogen Cat. No. 11905-031 ou uma mistura de lipídios I da Sigma, Cat. No. L0288). Um outro exemplo de um protetor de membrana é um polímero, álcool polivinílico (PVA). Qualquer combinação de protetores de membrana descritos aqui ou agentes semelhantes pode ser utilizada no meio crioprotetor. Por exemplo, uma ou mais proteínas, como uma ou mais proteínas de origem animal e/ou uma ou mais proteínas de origem de plantas e/ou

20 uma ou mais proteínas recombinantes podem ser incluídas no meio crioprotetor, o qual também pode ser composto de protetores de membrana adicionais, tais como um ou mais lipídios (por exemplo, um ou mais lipídios de origem animal e/ou um ou mais lipídios de origem de plantas e/ou um ou mais lipídios sintéticos, qualquer mistura destes tipos de lipídios) e/ou PVA. A concentração do protetor de membrana pode ser determinada

25 empiricamente, utilizando-se métodos conhecidos por aqueles adestrados na arte. Em certas realizações, a concentração do protetor de membrana é de cerca de 1% em peso/volume a cerca de 50% em peso/volume, como 3% em peso/volume para o pó de leite desnatado. Alternativamente, a concentração pode ser de cerca de 1% em volume/volume a cerca de 90% em volume/volume, como 23% em volume/volume para gema de ovo e 90%

30 para leite. Em todas as realizações, a concentração pode ser qualquer concentração dentro destas faixas.

Removedor de radical livre

O componente removedor de radical livre (também referido como um agente removedor de radical livre) do meio crio- protetor pode ser qualquer removedor que seja

35 compatível com a viabilidade do esperma e suficientemente efetivo (ativo) que remove ou inativa radicais livres (espécies de oxigênio reativo) na combinação a tal ponto que a percentagem (número) de células (esperma) que sobrevivem à crioconservação e podem

fertilizar os oócitos é consistentemente melhorada. Um componente removedor de radical livre pode ser qualquer composto ou molécula, como um agente redutor ou um antioxidante, que tem estas características desejadas. Agentes removedores de radical livre úteis podem ser identificados conforme descrito no exemplo 4 e no exemplo 13, nos quais a habilidade do monotioglicerol de agir como agente redutor foi avaliada em utilizando-se um corante fluorescente e citometria de fluxo. Os agentes removedores de radical livre úteis no meio crio-protetor da invenção atual, alternativamente podem ser identificados por métodos conhecidos por aqueles adestrados na arte.

Um ou mais removedores de radical livre (por exemplo, um ou mais agentes redutores e/ou um ou mais antioxidantes) podem ser incluídos no meio crioprotetor. Em realizações específicas, o removedor de radical livre pode ser, por exemplo, um ou mais agentes redutores, tais como um ou mais dos seguintes: monotioglicerol (MTG), beta-mercapto-etanol, ditioneitol (DTT), Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditioeritritol, tioredoxina (TRX), ditionita, 2-mercapto-etilamina, dimetiltiouréia; ácido nordihidroguaiaretico (NDGA), 2,3-dimercapto-1-propanol ou hidroquinona. Alternativamente, o removedor de radical livre pode ser um ou mais antioxidantes, como um ou mais dos seguintes: um aminoácido ou derivado do mesmo (por exemplo, glutathione reduzida (GSH), cisteína, homocisteína, N-acetil cisteína (NAC), metionina, N-2-mercapto propionil glicina, alanina, glutathione), bilirubina, melatonina, manitol, ácido lipoico, 10,11-diidroxiaporfina (DHA), hidroxianisla butilada (BHA), hidroxitolueno butilado, ácido diidrolipoico, tetraidropapaverolina (THP), ácido 2-tiobarbituico, ou taurina, e inositol ácido dimercapto succínico. Além disso, o removedor de radical livre pode ser uma vitamina, como vitamina E (tocoferol ou um derivado do mesmo, como formas solúveis em água da vitamina E; vitamina C (ácido ascórbico); vitamina A, carotenóides, (Astaxantina), complexo de vitamina B (incluindo Inositol) ou coenzima Q); alopurinol, dimetil-sulfóxido, deferoxamina, uma enzima (como catalase, glutathione peroxidases ou superóxido dismutase), um esteroide (como 21-aminosteroides, metilprednisolona), ou glutathione.

Em uma realização específica do meio crioprotetor, o removedor de radical livre é o monotioglicerol. Nesta realização, o removedor de radical livre tipicamente está presente no meio crioprotetor em um nível de cerca de 50 μM a cerca de 50 mM (50.000 μM). Qualquer nível entre cerca de 50 μM a cerca de 50 mM (50.000 μM) de monotioglicerol pode ser utilizado. Em uma outra realização, o removedor de radical livre é glutathione reduzida (GSH). Nesta realização, o removedor de radical livre, tipicamente está presente no meio em um nível de cerca de 50 μM a cerca de 50 mM. Qualquer nível entre cerca de 50 μM a cerca de 50 mM (50.000 μM) de GSH pode ser utilizado. A concentração de outros removedores de radical livre pode ser determinada empiricamente e variará dependendo do agente específico utilizado.

Em uma realização específica do meio crioprotetor, o crioprotetor é um açúcar (por exemplo, rafinose ou lactose) ou um álcool de açúcar (por exemplo, glicerol) ou um álcool (por exemplo, propileno glicol) ou combinação de dois ou mais dos anteriores (por exemplo, lactose e/ou rafinose e propileno glicol ou lactose e/ou rafinose e glicerol); o protetor de membrana é uma macromolécula, como leite ou proteína de leite (como proteína de leite desnatado) ou leite desnatado ou gema de ovo; e o removedor de radical livre é um agente redutor, como monotioglicerol, ou um antioxidante, como GSH.

Em uma realização alternativa do meio crioprotetor (CP-FRS), o crioprotetor é um açúcar (por exemplo, rafinose, ou lactose) ou é um álcool de açúcar (por exemplo, glicerol) ou é um álcool (por exemplo, propileno glicol) ou uma combinação de dois ou mais dos anteriores (por exemplo, lactose e/ou rafinose e propileno glicol ou lactose e/ou rafinose e glicerol) e o removedor de radical livre é um agente redutor, como monotioglicerol ou ditiotreititol, ou é um antioxidante, como GSH.

Em outras realizações específicas, (pelo menos um; um ou mais) açúcar é rafinose ou lactose; o (pelo menos um; um ou mais) protetor de membrana é uma macromolécula, como um leite; e o (pelo menos um; um ou mais) agente redutor é o monotioglicerol (MTG). Em outras realizações específicas, (pelo menos um) açúcar é rafinose; a (pelo menos uma) macromolécula e uma proteína de leite; e o (pelo menos um) antioxidante é GSH. Alternativamente, o (pelo menos um; um ou mais) protetor de membrana é leite desnatado.

Em outras realizações específicas, o crioprotetor é um (pelo menos um; um ou mais) açúcar, como lactose ou um álcool de açúcar, como glicerol ou um álcool, como propileno glicol; ou (pelo menos um; um ou mais) protetor de membrana é gema de ovo (por exemplo, gema de ovo fresco, como a gema de ovo fresco de galinha) ou leite desnatado; e o (pelo menos um; um ou mais) removedor de radical livre é monotioglicerol (MTG) ou glutathione reduzido ou ditiotreititol (DTT). Em outras realizações específicas, o (pelo menos um; um ou mais) açúcar é rafinose; a (pelo menos uma; ou uma ou mais) macromolécula é leite desnatado ou uma proteína de leite; e o (pelo menos um; um ou mais) removedor de radical livre é GSH, MTG ou DTT.

Em uma realização específica, o método da invenção atual é um método de conservar criogenicamente esperma, composto da combinação do esperma com um meio crioprotetor que é composto pelo menos de um açúcar; pelo menos um protetor de membrana (por exemplo, uma macromolécula, como uma proteína ou um polímero); e pelo menos um removedor de radical livre, como um agente redutor ou um antioxidante. Pelo menos um açúcar pode ser qualquer dos açúcares descritos aqui. O protetor de membrana é um polímero, como álcool polivinílico ou Pluronic F-68; e pelo menos um agente removedor de radical livre pode ser qualquer agente redutor ou qualquer antioxidante descrito aqui ou uma combinação de um ou mais agentes redutores e um ou mais

antioxidantes.

As quantidades e concentrações relativas de cada um destes componentes do meio crioprotetor (crioprotetor, protetor de membrana, removedor de radical livre), assim como as quantidades e concentrações relativas de outros componentes do meio (por exemplo, água) podem ser determinadas empiricamente, utilizando-se métodos conhecidos por aqueles adestrados na arte para a produção de uma variedade de meios. Ver os exemplos.

Métodos de conservação de esperma

Os meios e métodos de crioconservação da invenção atual podem ser usados para a conservação de esperma de uma larga variedade de mamíferos em realizações específicas, e são utilizados para a crioconservação de esperma de roedores, tais como o esperma de camundongos ou ratos; o esperma bovino ou esperma humano. Conforme discutido em maiores detalhes abaixo, o meio e métodos podem ser usados com qualquer família/sub-família ou estoque de camundongos. Em condições específicas, a composição do meio de crioconservação poderá ser ajustada em relação ao seus componentes e/ou as suas concentrações respectivas, para melhorar a eficiência do meio na proteção do tipo específico de esperma (por exemplo, ajustado para servir a uma família específica de esperma de camundongos) da crio- conservação. Podem ser feitos ajustes empiricamente, utilizando-se métodos conhecidos por aqueles adestrados na arte. Por exemplo, a família de camundongos pode ser da mesma origem (por exemplo, C57BL/6; BALB/c; FVB/N; 129S3/SvIm) ou de estoque de origens diferentes.

O meio crioprotetor e os métodos desta invenção são especialmente úteis para a crioconservação de esperma de camundongos, como esperma de famílias de camundongos da mesma espécie, especialmente as famílias de camundongos C57BL, tais como C57BL/6, e portanto, para a produção de camundongos vivos de todos os tipos e famílias, tais como uma prole viva de C57BL, tais como uma prole viva de C57BL/6. O método pode ser usado para produzir prole viva de todos os camundongos com antecedentes de C57BL, tais como as famílias de C57BL6 especialmente a prole de C57BL6 (por exemplo, transgênicos geneticamente modificados, anestesiados, assim como, mas não limitados a, prole viva 129, prole viva FVB e prole viva BALB/c. Ver, por exemplo, as tabelas 3A e 3B).

O esperma que é processado pelo método utilizando-se o meio crioprotetor da invenção atual pode não ser ejaculado, com aquele obtido conforme descrito aqui, ou esperma ejaculado. A combinação de meio crioprotetor-esperma pode ser colocada em frascos, tubos criogênicos, e ampolas de vidro, mini-cordões ou cordões para a conservação criogenia e estocagem subsequente. A quantidade ou concentração de esperma a ser usada pode ser determinada empiricamente, utilizando-se métodos conhecidos, levando-se em consideração fatores tais como o tipo de esperma e o tipo, tamanho e formato do recipiente que está sendo utilizado. Nas condições nas quais o esperma de camundongos

está sendo crioconservado ou utilizado, geralmente são usados 0,3 x ou 3 x esperma por 10 μ l de CPM ou CP-FRS. A concentração de 1x é definida de tal forma que o esperma de um macho é recolhido em 1 ml de CPM ou de CP-FRS. No caso dos camundongos C57BL/6, esta é uma concentração na faixa de $31,5 \pm 2,8 \times 10^6$ esperma/ml. Para outras famílias e espécies, a concentração ótima poderá ser diferente daquela para o esperma C57BL/6 e pode ser determinada empiricamente utilizando-se técnicas conhecidas pela pessoa adestrada na arte.

Conjuntos

Em outro aspecto, a invenção atual apresenta qualquer das composições descritas aqui em conjuntos, opcionalmente incluindo instruções para o uso das composições (por exemplo, para a conservação de esperma e/ou outras células). Isto é, o conjunto pode incluir uma descrição de uso de uma composição em qualquer método descrito aqui. Um "conjunto", conforme usado aqui, define tipicamente uma embalagem, conjunto ou recipiente (como um recipiente isolado) e incluindo um ou mais dos componentes da invenção, e/ou outros componentes associados com a invenção, por exemplo, conforme descrito anteriormente. Cada um dos componentes do conjunto poderá ser fornecido na forma líquida (por exemplo, em solução) ou na forma sólida (por exemplo, um pó seco, congelado, etc).

Em alguns casos, o conjunto inclui um ou mais componentes, que poderão estar no mesmo ou em dois ou mais receptáculos, e/ou em qualquer combinação dos mesmos. O receptáculo é capaz de conter um líquido, exemplos não limitantes incluindo garrafas, frascos, jarras, tubos, frascos, bécheres, ou semelhantes. Em alguns casos, o receptáculo é a prova de respingos (quando fechado, o líquido não pode sair do receptáculo, independentemente da orientação do receptáculo).

Em algumas realizações, um conjunto poderá ser composto de dois ou mais protetores de membrana, um removedor de radical livre, ou um agente crioprotetor, que poderá estar no mesmo receptáculo, ou dividido entre dois ou mais receptáculos. Como um exemplo específico, não limitante, um primeiro receptáculo poderá conter pelo menos dois dos protetores de membrana, o removedor de radical livre, e o agente crioprotetor, enquanto que um segundo receptáculo poderá conter um componente que não está presente no primeiro vaso. Em alguns casos, os componentes do conjunto poderão estar contidos dentro de um recipiente adequado, como uma caixa de papelão, uma caixa de isopor, etc. O conjunto poderá ser despachado na temperatura ambiente (em torno de 25 ° C), resfriado (por exemplo, em torno de 4 ° C), e/ou qualquer um ou mais dos componentes poderá ser despachado congelado (por exemplo, entre -20 ° C e -80 ° C, em torno de -150 ° C, etc) ou em nitrogênio líquido (em torno de -196 ° C). Em alguns casos, um ou mais dos componentes são congelados e/ou despachados sobre gelo seco (em torno de -80 ° C).

Com relação a soluções congeladas, se está presente mais de um componente (por exemplo, conforme descrito acima), os componentes poderão ser congelados em conjunto ou em um líquido comum (por exemplo, dentro de um receptáculo comum), ou como dois ou mais líquidos separados (por exemplo, dentro de receptáculos separados).

5 Em certos casos, alguns dos componentes poderão ser processáveis (por exemplo, até uma forma ativa), por exemplo, pela adição de um solvente adequado ou outra espécie, que poderá ou não ser fornecida com o conjunto. Por exemplo, o componente poderá ser aquecido ou um líquido poderá ser adicionado no componente (por exemplo, se o componente é congelado, liofilizado, despachado na forma concentrada, etc).

10 Em uma realização, o conjunto para uso na crioconservação de esperma é composto pelo menos de um crioprotetor; pelo menos um removedor de radical livre; e pelo menos um protetor de membrana. Em uma realização específica, o removedor de radical livre foi identificado por um método descrito aqui. Em outras realizações, o conjunto é composto pelo menos de um crioprotetor e pelo menos um removedor de radical livre.

15 Em alguns casos, o conjunto incluirá um vaso criogênico que é um vaso adequado para conter materiais em temperaturas criogênicas, por exemplo, nitrogênio líquido. Aqueles com conhecimento normal na arte têm conhecimento de vasos criogênicos adequados, por exemplo, um frasco Dewar (por exemplo, formado de aço inoxidável e/ou alumínio, etc), um transportador vaporizado, um recipiente de aço inoxidável, um recipiente de isopor, ou
20 semelhante. Tipicamente, temperaturas criogênicas incluem temperaturas em torno de -150 ° C, abaixo de cerca de -170 ° C, ou abaixo de cerca de -190 ° C. Por exemplo, o nitrogênio líquido tem um ponto de ebulição em torno de -196 ° C.

O conjunto poderá também conter um receptáculo para reter o esperma e/ou outras células. Em alguns casos, este receptáculo é capaz de conter o líquido que contém o
25 esperma, e/ou uma solução congelada ou líquido contendo o esperma. Por exemplo, o receptáculo poderá ser construído de forma que possa suportar temperaturas criogênicas sem se romper ou fraturar. Em algumas realizações, o receptáculo pode ser colocado dentro de um vaso criogênico, conforme descrito acima, por exemplo, utilizando-se um flutuador (por exemplo, que pode flutuar sobre nitrogênio líquido ou outro líquido criogênico dentro do
30 vaso criogênico). Exemplos não limitantes de receptáculos para esperma e/ou outras células adequados incluem tubos de células, ampolas de vidro, tubos criogênicos, frascos criogênicos, etc. O receptáculo poderá ser marcado previamente, em certos casos.

Exemplos de outras composições ou componentes associados com a invenção incluem, mas não são limitados a, diluentes, sais, soluções tampão, agentes quelantes,
35 conservantes, agentes de secagem, antimicrobianos, agulhas, seringas, materiais de embalagem, tubos, garrafas, frascos, bécheres, e semelhantes, por exemplo, para uso, modificação, montagem, estocagem, embalagem, preparação, mistura, diluição, e/ou

conservação dos componentes para um uso específico. Em realizações onde são utilizadas formas de líquidos de qualquer dos componentes, a forma líquida poderá ser concentrada ou pronta para utilização.

Um conjunto da invenção geralmente incluirá instruções ou instruções para um local da Internet ou outra fonte de qualquer forma, que são fornecidos para uso do conjunto em relação aos componentes e/ou aos métodos da invenção. Por exemplo, as instruções poderão incluir instruções para uso, modificação, mistura, diluição, conservação, montagem, estocagem, embalagem, e/ou preparação dos componentes e/ou outros componentes associados com o conjunto. Em alguns casos, as instruções poderão também incluir instruções para a administração de componentes, por exemplo, para o despacho na temperatura ambiente, em temperaturas sub-zero, temperaturas criogênicas, etc. As instruções poderão ser fornecidas em qualquer forma que seja útil para o usuário do conjunto, tais como escritas ou orais (por exemplo, telefônica), digital, ótica, visual (por exemplo, videotape, DVD, etc) e/ou comunicações eletrônicas (incluindo comunicações pela Internet ou com base na Web), fornecidas de qualquer forma.

Conforme utilizado aqui, as instruções podem incluir protocolos, indicações, orientações, avisos de alerta, etiquetas, notas, e/ou "perguntas feitas com frequência" (FAQs), e tipicamente envolvem instruções por escrito sobre, ou associadas com a invenção e/ou com a embalagem da invenção. As instruções também podem incluir comunicações instrutivas em qualquer forma (por exemplo, oral, eletrônica, digital, ótica, visual, etc), fornecidas de qualquer forma (por exemplo, dentro ou separado de um conjunto) de tal forma que um usuário reconhecerá claramente que as instruções devem ser usadas com o conjunto.

Como um exemplo, um conjunto, conforme discutido aqui, poderá ser despachado para um usuário, tipicamente com instruções para uso. Por exemplo, as instruções poderão instruir o usuário a adicionar o esperma em um protetor de membrana e no removedor de radical livre, e estocar a combinação resultante e/ou retornar o conjunto e o esperma para quem o enviou. Em outro exemplo, as instruções poderão instruir o usuário a combinar o esperma, o protetor de membrana, o removedor de radical livre, e o agente crioprotetor, e crioconservar a combinação resultante (por exemplo, conforme descrito acima). A combinação crio- conservada poderia então ser estocada, retornada para quem a enviou para estocagem e recuperada mais tarde, ou semelhante.

Identificação de removedores de radical livre

Uma realização é um método de identificação de um removedor de radical livre adequado para uso na crio- conservação de esperma, que é composto da avaliação pelo menos de uma das atividades seguintes de um removedor de radical livre candidato: (a) capacidade (habilidade) para reduzir as espécies de oxigênio reativo no esperma; (b) o

efeito da mobilidade do esperma; e (c) o efeito sobre a vitro- fertilização, onde o removedor de radical livre candidato produz um efeito benéfico sobre pelo menos um dos (a), (b) ou (c), o removedor de radical livre candidato é um removedor de radical livre. Por exemplo, se há uma redução na espécie de oxigênio reativo no esperma quando o esperma é contatado, combinado ou incubado com o removedor de radical livre candidato, o removedor de radical livre candidato é um removedor de radical livre adequado para uso na crioconservação do esperma. Se a mobilidade do esperma é aumentada ou pelo menos é mantida substancialmente no mesmo nível de antes da crio- conservação, quando o esperma é contatado, combinado ou incubado com um removedor de radical livre candidato, o removedor de radical livre candidato é um removedor de radical livre adequado para uso na crioconservação de esperma. Se a fertilização in vitro é aumentada ou pelo menos é mantida substancialmente no mesmo nível de antes da crioconservação, quando o esperma é contatado, combinado ou incubado com um removedor de radical livre candidato, o removedor de radical livre candidato é um removedor de radical livre adequado para uso na crio- conservação de esperma. Em uma realização, se um removedor de radical livre a ser identificado é um removedor de radical livre para uso na crioconservação de esperma de camundongos, as atividades (a) e/ou (c) são avaliadas. Em uma realização, se o removedor de radical livre a ser identificado é um removedor de radical livre para uso na crioconservação de esperma bovino, a atividade (a) e/ou a atividade (b) são avaliadas. O método pode ser executado utilizando-se várias técnicas para a detecção do efeito, se algum, de um removedor de radical livre candidato, como em um método no qual é utilizado um corante. Em uma realização, o método é composto da incubação (a) de esperma carregado com um indicador de permeação de célula (corante) para uma espécie de oxigênio reativo que não é fluorescente, a não ser que ocorra a oxidação dentro do esperma e (b) um removedor de radical livre candidato, dessa forma produzindo uma combinação incubada e avaliando o nível de espécie de oxigênio reativo dentro do esperma na combinação incubada. Se é reduzido o nível de espécie de oxigênio reativo no esperma (por exemplo, em relação ao nível de espécie de oxigênio reativo dentro do esperma na ausência do removedor de radical livre candidato), o removedor de radical livre candidato é um removedor de radical livre adequado para uso na crio- conservação de esperma. Um removedor de radical livre identificado através da avaliação de uma ou duas das três atividades descritas acima, pode ser adicionalmente avaliado em relação a sua utilidade como um removedor de radical livre, através da avaliação de atividades adicionais. Por exemplo, se a capacidade (habilidade) para reduzir a espécie de oxigênio reativo no esperma é avaliada, o efeito do removedor de radical livre sobre a mobilidade do esperma, o seu efeito na fertilização in vitro; ou ambos podem ser avaliados, conforme seja apropriado, para produzir indicação adicional da adequação do removedor de radical livre para o uso na

crioconservação de esperma.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes descrevem o uso do meio e de métodos da invenção atual. Eles não se destinam a ser limitantes de forma alguma.

5 Exemplo 1: Crioconservação de esperma de camundongos

Relatórios históricos detalharam que as taxas de recuperação de nascimentos vivos, quando é utilizado o esperma de C57BL/6, tipicamente varia de 0% a menos de 10% (Glenister and Thornton, 2000). Nakagata relata uma taxa de fertilização de 26% (Nakagata and Takeshima, 1993). A aplicação de procedimentos muito complexos, como o método em
10 duas etapas para escolher esperma de melhor qualidade no descongelamento de Bath et al., 2003, melhora as taxas de fertilização, mas não é adequado para a estocagem eficiente (incluindo a recuperação) de grandes quantidades de famílias de C57BL/6 através de crioconservação de esperma.

O Laboratório Jackson tem trabalhado no desenvolvimento de uma técnica econômica, viável, para se conseguir famílias de cruzamento e especialmente de C57BL/6. É descrito aqui um meio de crioproteção modificado (CPM) que produz uma abordagem econômica para este problema.

Tabela 2: Comparação de técnicas de crioconservação: capacidade de caracterização e de fertilização de esperma C57BL/6J

20

CPM	% de Acrosomas intactos após descongelamento	% de membranas intactas após congelamento	% 2 células
Método tradicional	16,1 ± 0,06	22,5 ± 0,08	7,03 ± 0,35 ^b
Método CPM	16,8 ± 0,13	26,4 ± 0,22	19,2 ± 0,26 ^a

Fêmeas CByB6F1 foram utilizadas para a doação de oócitos; foram feitas comparações de percentagens utilizando-se uma transformação de arcsina; as percentagens dentro de uma coluna tendo um superescrito único (a e b) são diferentes com Tukey-Kramer HSD ($p < 0,05$); (ver a tabela 2). A tabela 2 mostra que não foram anotadas
25 diferenças mensuráveis na viabilidade do esperma de camundongos ou na percentagem de espermatozoides vivos tendo acrosomas intactos, mas que existe uma diferença significativa na taxa de fertilização de esperma de camundongos (% com 2 células) com 19% utilizando o CPM contra 7% utilizando o método tradicional.

Os solicitantes demonstraram que as taxas de fertilização são grandemente e
30 consistentemente melhoradas quando o meio e os métodos descritos aqui são executados. As epididimidas e "vas deferencia" são extraídos do macho C57BL/6J e colocados no meio

crioprotetor descrito aqui. Eles são extraídos e colocados em uma porção de recolhimento de 1 ml incubada do meio crioprotetor (CPM), que é composto, por exemplo, de rafinose [18%, peso/volume], leite desnatado [3%, peso/volume] e monotioglicerol (MTG) em concentrações de 159 μ M a 636 μ M. São feitas incisões nos tecidos, permitindo que o

5 esperma nade para dentro do CPM; isto é permitido durante pelo menos 5, mas não menos do que 20 minutos. Os tecidos residuais são então removidos da porção de recolhimento. 10 μ L da amostra de esperma são colocados em tantos quantos uma centena de "French straws" de 250 μ L (IMV ;Maple Grove, MN). Canudos de duzentos e cinquenta microlitros contendo uma coluna de COM de 5,5 cm, uma coluna de ar de 2,5 cm, uma coluna de 0,6

10 cm de amostra de esperma seguida por uma coluna de ar, são selados com um selante térmico instantâneo. Os canudos são colocados dentro de cassetes e são expostos ao vapor de nitrogênio líquido durante pelo menos 10 minutos antes de serem adicionados ao nitrogênio líquido. Isto essencialmente resfria o esperma com uma velocidade de 37 ° C/min.

Após a estocagem em nitrogênio líquido, três amostras de cada tratamento são

15 descongeladas em um banho de água a 37 ° C durante 30 segundos, e então cada uma das porções de 10 μ L é colocada diretamente na sua porção de fertilização in vitro de 500 μ L (IVF) de "Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia)". Depois de 1h de incubação, quatro conjuntos de oócitos intactos acumulados de fêmeas superovuladas C57BL/6J são adicionados nas porções de fertilização in vitro. O IVF é executado utilizando-

20 se métodos conhecidos por aqueles adestrados na arte, como através dos métodos descritos por Nakagata. (Nakagata, 2000a; Nakagata 2000b). O esperma e os oócitos são incubados em conjunto durante 4h antes dos zigotos presumidos serem removidos da porção IVF e são colocados em uma porção de cultura para incubação durante a noite.

Aproximadamente 18h mais tarde, é determinada a percentagem de oócitos que se

25 desenvolveu em embriões de duas células (# embriões de duas células / # total de oócitos). Para a análise estatística, as percentagens de arcsina transformada e as médias pelo menos de 3 porções IVF por tratamento são avaliadas com um teste T. Uma diferença entre os tratamentos é ilustrada com um asterístico ($p < 0,05$). Para a apresentação, os erros médios e standard foram convertidos de volta para percentagens.

30 Todas as concentrações de MTG mostram uma taxa melhorada de fertilização em relação aos resultados obtidos utilizando-se os métodos disponíveis atualmente. Uma concentração de MTG de 477 μ M produziu os melhores resultados. Ver a figura 1 e a tabela 3 e a tabela 4A.

35 Tabela 3: Taxa de fertilização utilizando camundongos C57BL/6J e o método CPM ou o tradicional

	Taxa fertilização	Embriões de 2 células transferidos	Nascidos vivos
CPM	68,4%	225	80

Método tradicional	6,5%	45	7
--------------------	------	----	---

No dia seguinte, os embriões de duas células podem ser transferidos para recipientes pseudo-grávidas ou crio- conservados para uso mais tarde.

5 Metodologias anteriores produziram taxas de fertilização menores do que 10% (Songsasen and Leibo, 1997; Sczygiel et al., 2002; Sztejn et al., 2001; Thornton et al., 1999) quando utilizando o esperma crioconservado de C57BL6/J no procedimento standard IVF sem qualquer manipulação dos oócitos e sem uma pré-seleção do esperma, não utilizando injeção de esperma intra-citoplásmico (ICSI). Há apenas um relatório que reivindica ter obtido 26% de taxa de fertilização para C57BL6/J (Nakagata and Takeshima, 1993).
10 Utilizando a técnica descrita aqui, que inclui o uso de removedor de radical livre, foram obtidas taxas de fertilização maiores do que 75%. Estes métodos também melhoraram grandemente e consistentemente as taxas de fertilização observadas também para outras famílias de camundongos. Por exemplo, utilizando-se os métodos anteriores, não era incomum encontrar-se taxas de fertilização para BALB/cJ, FVB/NJ, e 129P3/J menores do que 10%, 30% e 5%, respectivamente.

15 Os camundongos referidos aqui como 129P3/J foram referidos nas solicitações de prioridade como camundongos 129P/J. Esta é a única alteração na nomenclatura. O método descrito aqui resultou em taxas de fertilização observadas de 58%, 98% e 48%, respectivamente. Ver as tabelas 4A e 4B.

20 Tabela 4A: Avaliação das taxas de fertilidade em famílias diferentes de camundongos

Tratamento	Famílias						
	129X1/SvJ	129S1/SvimJ	BALB/cByJ	BALB/cJ	C3H/HeJ	FVB/NJ	C57BL/BJ
	Taxa média de fertilização						
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)
Método 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)

Tabela 4B: Avaliação das taxas de fertilidade em famílias diferentes de camundongos

Família de camundongos	CPM (+MTG)	Método tradicional
129P3/J	48,20%	12% (Songsasen e Leibo, 1997)

A/J	92,67%	Nenhum dado
CAST/EiJ	2,38%	0%
DBA/2J	87,85%	45%
FVB/NJ	98,6%	27,4%
NOD/LtJ	75,21%	Nenhum dado
SJL/J	46,56%	Nenhum dado

Exemplo 2: Crioconservação de espermatozoides de camundongos com GSH contendo COM

Os solicitantes demonstraram que as taxas de fertilização são grandemente e consistentemente melhoradas quando são executados o meio e os métodos descritos. Os epididimídios e "vas deferentia" são extraídos do macho C57BL/6J e são colocados no meio crioprotetor descrito aqui. Ele são extraídos e colocados em uma porção de recolhimento de meio crioprotetor (CPM) de 1 ml incubado composto de rafinose [18%, peso/volume], leite desnatado [3%, peso/volume] e glutatona reduzida (GSH ; 500 μ M a 50 mM). Foram feitas incisões nos tecidos, permitindo que o espermatozoide nadasse para dentro do CPM; isto é permitido durante pelo menos 5, mas não menos do que 20 minutos. Os tecidos residuais são então removidos da porção de recolhimento. 10 μ L de amostra de espermatozoides são colocados em tantos quantos uma centena de "French straws" de 250 μ L (IMV; Maple grove, MN). Dois canudos de 250 μ L, contendo uma coluna de 5,5 cm de CPM, uma coluna de ar de 2,5 cm, uma coluna de 0,6 cm de amostra de espermatozoides seguido por uma coluna de ar, são selados com um selante térmico instantâneo. Isto resfria instantaneamente o espermatozoide com uma velocidade de 37 ° C/min. Depois de serem estocadas em nitrogênio líquido, três amostras de cada tratamento são descongeladas em um banho de água a 37 ° C durante 30 segundos, e então cada porção de 10 μ L é colocada diretamente na sua porção de fertilização in vitro (IVF) de 500 μ L de "Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia)". Depois de 1h de incubação, 4 conjuntos de oócitos acumulados intactos de fêmeas C57BL/6J superovuladas são adicionados nas porções de fertilização in vitro (Nakagata, 2000a; Nakagata, 2000b).

O espermatozoide e os oócitos são incubados em conjunto durante 4h antes dos zigotos presumido serem removidos da porção de IVF e colocados em uma porção de cultura para incubação durante a noite.

Aproximadamente 18h depois, é determinada a taxa de fertilização (embriões de # duas células / # total de oócitos). Para a análise estatística, as percentagens são de arcsina transformada e as médias das porções de 3 IVF por tratamento são comparadas com o controle sem nenhum GSH, utilizando os métodos Dunnett. Os resultados são apresentados na figura 2. Uma diferença significativa em relação ao controle é ilustrada com um asterístico. Para a apresentação, os erros médios e standard são convertidos de volta para

percentagens.

O teste de concentrações diferentes de GSH revela que a concentração de 500 μ M a 5 mM aumentam as taxas de fertilização, em comparação com o CPM sem um agente de redução. O uso de 500 μ M de GSH mostra uma melhoria nas taxas de fertilização semelhante àquela obtida com 477 μ M de MTG sob condições semelhantes.

Exemplo 3: As taxas de fertilização com o esperma crio- conservado de várias famílias de camundongos são diferentes na resposta à crioconservação com MTG.

Porções de dez μ L de esperma de varias famílias de camundongos são congeladas na ausência de (CPM-MTG) ou na presença de monotio glicerol (CPM). Foi utilizado um total pelo menos de seis amostras de esperma por tratamento de cada família. Isto representou pelo menos três amostras de pelo menos dois conjuntos de dois machos, cujo esperma foi recolhido no momento do recolhimento e então foi dividido em dois tratamentos. Após o descongelamento, as amostras são colocadas diretamente na sua própria porção de fertilização in vitro (IVF) de 500 μ L da Cooks Mouse Vitro Fest (Cook Australia; Queensland, Australia; (Quinn et al., 1995)). Depois de 1h de incubação, quatro conjuntos de oócitos intactos acumulados de famílias isogênicas são adicionados no meio de incubação. Após uma incubação conjunta de 4h, os zigotos presumidos são lavados e cultivados durante a noite. Aproximadamente 18h mais tarde, é determinada a taxa de fertilização (# de embriões de duas células / # total de oócitos). Ver tabela 5

Tabela 5: Taxas de fertilização determinadas na presença (CPM) e na ausência de MTG (CPM-MTG)

Tratamento	Família		
	129S1/SvimJ	BALB/cJ	C57BL/6J
CPM-MTG	31,1%	46,2%	49,0%
CPM	48,1%	58,4%	68,4%

Exemplo 4: Avaliação da redução da espécie de oxigênio reativo (ROS) pelo MTG - Descrição do removedor de radical livre pelo método de corante/esperma

O esperma crioconservado na presença e na ausência do removedor de radical livre, o agente de redução monotio- glicerol (MTG), são colocados com o corante verde fluorescente CM-H2DCFDA para medir a espécie intracelular de oxigênio reativo. O esperma é testado com vários níveis de peróxido de terc-butilidrogênio para induzir danos oxidativos e a fluorescência verde é medida utilizando-se citometria de fluxo. Conforme mostrado na figura 3, o MTG reduz o ROS no esperma crioconservado, tanto para os camundongos C57BL/6J como para os BALB/cByJ (BALB/cBy).

Exemplo 5: Crioconservação e recuperação de esperma de famílias de

camundongos modificados geneticamente

Foram utilizadas as mesmas abordagens em relação ao esperma obtido dos machos C57BL/6J tendo modificações genéticas e contribuições genéticas variáveis da família 129, assim como de outras famílias, tais como a de FVB/N.

5 Porções de dez μL de esperma de várias famílias de camundongos modificados geneticamente são congeladas no CPM com 477 μM de monotioglicerol como o removedor de radical livre (CPM) de acordo com o método descrito no exemplo 1. Para os camundongos transgênicos contendo um padrão de expressão YAC, foi recolhido o esperma da família Tg(YAC72)2511 Hay suportado por FVB/NJ. Para camundongos que
10 apresentavam modificações devido ao esperma direcionado para o gene (nocaute) do nocaute PLAU de famílias de camundongos, foi recolhido o nocaute de 3β sintase quinase de glicogênio e o nocaute de doze membros do transportador de cátions e anions / 22 orgânicos da família do veículo do soluto. O suporte da família significa aqui uma contribuição de 50% ou mais desta família para o suporte genético da família de
15 camundongos. A taxa de fertilização foi determinada (# embriões com duas células / # total de oócitos) e a percentagem média foi calculada. Os valores dentro de parênteses ilustram o # total de duas células / número total de oócitos ao longo de IVFs. Conforme mostrado na tabela 6, foram obtidas taxas elevadas de fertilização em todos os casos. Isto demonstra que a crioconservação de plasma de germe de camundongos machos para a reconstituição
20 da família é uma opção viável.

Tabela 6: Capacidade de fertilização de esperma a partir de camundongos modificados geneticamente

Nr. de referencia JR	Suporte de família	Modificação genética	% do estagio de 2 cel. (# 2 cel / # oócitos)
3640	FVB/NJ	Transgene Tg(YAC72)2511 Hay	81 (105/130)
3238	BALB/cJ	Nocaute c2ta (transativador classe II)	76(112/148)
2329	FVB/NJ	Nocaute PLAU (ativador plasminogen, uroquinase)	86 (15/176)
5817	C57BL/6J	Nocaute glicogenio sintase quinase 3β	65 (72/111)
5839	C57BL/6J	Nocaute da familia de vehiculo soluto 22 organicos/12 membros	68 (53/78)

		transportador anions cations	
--	--	---------------------------------	--

Exemplo 6: Determinação da concentração e da mobilidade do esperma

Para se determinar a concentração, mobilidade, e mobilidade e progressiva de esperma "Recolhido recentemente a", o esperma tipicamente é diluído a 1:20 em solução salina tamponada com fosfato ou em Cooks mouse vitro fert (Cook Australia; Queensand, Australia; (quinn et al., 1995)). para a avaliar o esperma descongelado, o esperma é incubado em meio IVF durante 1h, com uma diluição de 1: 50 na porção IVF. e ele então é colocado em um analisador de sêmen computadorizado Hamilton Thorn IVOSS (Hamilton, Thorn, Bevevry, MA). para medição, os parâmetros de calibração a são ajustados como se segue:

- 10 Número de aplicações: 2
- Reproduções adquiridas: 30
- Velocidade da reprodução: 60 Hz
- Contraste mínimo: 30
- Tamanho mínimo de célula: 4 pixels
- 15 Contraste estático mínimo: 15
- Retidão (STR), limite mínimo: 50%
- "Culoff VAP baixo": 10,0 $\mu\text{m/s}$
- "Culoff VAP médio": 50,0 $\mu\text{m/s}$
- "Culoff VSL baixo": 0,0 $\mu\text{m/s}$
- 20 Tamanho da cabeça, não móvel: 13 pixels
- Intensidade da cabeça, não móvel: 75
- Tamanho estático da cabeça: 0,57 a 2,91
- Intensidade estática da cabeça: 0,14 a 1,84
- Alongamento estático: 0 a 87
- 25 Movimentação lenta das células: SIM
- Ampliação: ,82
- Fonte de vídeo: Câmera
- Freqüência de vídeo: 60
- Campo de luminosidade: Não
- 30 Luminosidade para o LED: 2663
- Luminosidade para o Ident: 3000
- Ajuste de temperatura: 37 ° C
- Tipo de célula: Usuario
- Regulagem da profundidade da célula: 100,0 μm

Modo de seleção do campo: ESCOLHER

Ativo ident: NÃO

Modo ident: B

Tempo de integração: 1 quadro

5 Óticos
 Ganho do vídeo: Médio
 Brilho do vídeo: 2300
 Contraste do vídeo: 40
 Nível de sincron. do vídeo: Nível de sincron. FW 100

10 Sincronização do vertical do vídeo: 75
 Saída#2
 Pontos na trilha: 16 a 100
 Velocidade da trilha (VCL): 146,0 as 1000,0
 Linearidade (LIN): 0,0 a 20,0

15 Exemplo 7: Avaliação da capacidade de fertilização do esperma depois da crioconservação

Para assegurar que a melhoria da capacidade de fertilização do esperma C57BL/6J após a crioconservação não é somente o desenvolvimento de embriões com duas células, os solicitantes também transferiram os embriões para recipientes pseudo-grávidas. Dos 225
 20 embriões transferidos, de um total de 3 inoculações de 3 machos, 80 se desenvolveram até o fim (35,6%). Isto é uma melhora de aproximadamente três a cinco vezes em relação aos dados anteriores obtidos pelos solicitantes e vários outros laboratórios IVF com o esperma C57BL/6 crioconservado (Figura 4).

25 Exemplo 8: Crioconservação de esperma de camundongos modificados geneticamente com MTG contendo CPM e recuperação dos nascidos vivos

Porções de dez μL de uma variedade de famílias de camundongos, conforme listado na tabela 7, são congelados em CPM com 477 μM de monotioglicerol como ROS (CPM). É utilizado um total pelo menos de seis amostras de esperma por tratamento dentro de uma família. isto representou pelo menos três amostras de cada um pelo menos de dois
 30 conjuntos de dois machos, cujo esperma foi inoculado no momento do recolhimento e então dividido em dois tratamentos. Após o descongelamento, as amostras são colocadas diretamente na sua própria porção de fertilização in vitro (IVF) de 500 μL de Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia; (Quinn et al., 1995)). Depois de 1h de incubação, quatro conjuntos de oócitos intactos de famílias isogênicas foram adicionados no
 35 meio de incubação. Após uma incubação conjunta de 4h, os zigotos presumidos foram lavados e cultivados durante a noite. Aproximadamente 18h mais tarde, foi determinada a

taxa de fertilização (percentagem de 2 células: # embriões de duas células / # de total de oócitos, ver a tabela 7). Foi determinada a percentagem média. Para cada linha, cerca de 30 embriões com duas células foram implantados em fêmeas receptivas. Depois de aproximadamente 21 dias, foi determinado o número de camundongos nascidos vivos, 5 mostrado como percentagem de nascidos vivos na tabela 7.

Em resumo, os procedimentos descritos aqui, nos quais foi utilizada o meio crioprotetor conforme descrito acima, apresentou resultados bons e consistentes para o esperma de camundongos modificado geneticamente, comparáveis com as famílias paternas cruzadas. Com as famílias paternas, foram obtidas as seguintes taxas de 10 fertilização: 129 S1/SvimJ 18%; C57BL/6J 68%; Balb/cJ 58%, para BALB/cByJ 69%, e FVB/NJ 98%.

Tabela 7:

	Doador do esperma	Doador de oócito	# oócitos
15	C57BL/6-Tg(Cwsftr-EGFP-NGFR/FKBP1A/TNFRSR6)2Bck/J	C57BL/CJ	219
	B6(Cg)-Ncf1<m1>/J	C57BL/CJ	218
	B6.Cg-Mapt<tm1(EGFP)Klt> Tg(MAPT)8cPdav/J	C57BL/CJ	224
20	B6.129S-Shh<tm2(cre/ESR1)C/t>/J	C57BL/CJ	182
	B6;C3H-Tg(Scgb1at-Scnn1b)6608Bouc/J	B6C3FeF1	209
	CbyJ.A-Ttc7<fsn>/J	BALB/cByJ	221
	B6.129S2©-Stat6<tm1Gru>/J	C57BL/CJ	223
	C3.B6-Tg(Fabp1-Ccnd1)4Rdb/J	C3H/HeJ	138
25	B6.129S1-Csf2rb1<tm1Cgb>/J	C57BL/CJ	253
	B6.HRS(BKS)-Cpe<fat>/J	C57BL/CJ	237
	B6.D2N-Ahr<d>/J	C57BL/CJ	143
	B6.Cg-F2rl1<tm1Mslb>/J	C57BL/CJ	186
	B6.129P2-P2rx7<tm1Gab>/J	C57BL/CJ	242
30	FVB-Tg(Sod1-G86R)M1Jwg/J	FVB/NJ	134
	C.Cq-Fv4<r>/HmJ	BALB/cJ	138
	C.Cg-Gata1<tm6Sho>/J	BALB/cJ	70
	STOCK Dicer1<tm1Bdh>/J	C57BL/CJ	217
	B6.Cg-Gusb,mps>/BrkJ	C57BL/CJ	289
35	B6.129S4-Cxcl10<tm1Adl>/J	C57BL/CJ	257
	B6.CgMsr1<tm1Csk>/J	C57BL/CJ	161

	B6;129S7-Ephb4<tm1And>/J	C57BL/CJ	285
	B6.Cg-Tg(F2RL1)1Mslb/J	C57BL/CJ	235
	B6.129S2-Thbs1<tm1Hyn>/J	C57BL/CJ	204
	B6.Cg-Tg(PDGFB-APPSwInd)20Lms/2J	C57BL/CJ	232
5	B6.C3-Gusb<mps-2J>/BrkJ	C57BL/CJ	188
	B6.C-H2<bm1>/ByBir-Gusb<mps>/SopJ	B6.C-H2<bm1>/ByJ	94
	B6.Cg-Tg(ACTB-EGFP)1Osb/LeySopJ	C57BL/CJ	299
	B6.129S6-Pt1tm1Hof/J	C57BL/CJ	227
	C3h/HeOuj-Gusb<mps-2J>/BrkJ	C3H/HeOuj	211
10	C57BL/6J-Kit<W-41J>/SopJ	C57BL/CJ	304
	129-Gt(ROSA)26Sor<tm1Luo>/J	129/SvImJ	281
	Cby.Cg-Gpi1<a-m1Ehs>/BrkJ	BALB/cJ	141
	B6.Cgi1<a-m1Ehs>/Brkj	C57BL/CJ	195

Exemplo 9: Crioconservação de esperma de ratos

15 Foram recolhidos os epididimidas e "vas deferentia" de um rato com idade de 33 semanas LEW/SsNHsd (Harlan, Indianapolis, Indiana). Foram feitas incisões no tecido e o esperma foi permitido nadar para dentro de 2 ml de uma solução contendo 18% de lactose [peso/volume] (Sigma Aldrich; St. Louis, MO) e 23% de gema de ovo [volume/volume] de ovos frescos em água destilada (Invitrogen; Carlsbad, California) durante 10 minutos. A

20 suspensão de esperma foi então dividida com a metade sendo colocada em uma solução de lactose/gema de ovo e a outra metade sendo colocada em uma solução em suspensão em lactose/gema de ovo contendo 954 μ moles de MTG em 15 ml de tubos cônicos. Isto resultou em uma concentração final de MTG de 477 μ M. Os tubos cônicos de 15 ml contendo as amostras de esperma foram colocados em um becher contendo aproximadamente 150 ml

25 de água a 15 ° C durante 10 minutos. Depois do período inicial de resfriamento, o becher contendo água e os tubos cônicos foram transferidos para um refrigerador a 4 ° C onde as amostras foram resfriadas durante 1h15. Depois do resfriamento a 4 ° C, o esperma foi diluído em seis composições diferentes de meio conforme descrito na tabela 8. O CPM para o esperma de rato tinha a seguinte composição: o crioprotetor era somente lactose ou

30 lactose e glicerol ou propileno glicol; o protetor de membrana era gema de ovo fresco de galinha e MTG como o removedor de radical livre.

O esperma foi colocado em "French straws" de 250 μ L (IMV; Maple grove, MN; cat# AAA201), que foram então selados com um selante térmico instantâneo (modelo AIE-305HD; American International Electric; Whittier, CA) e 5 dos mesmos foram colocados em

35 cassetes (Zanders Medical Supplies; Vero Beach, FL). Os cassetes foram colocados sobre um flutuante situado dentro de uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido e as amostras foram expostas ao vapor de LN2 durante pelo menos 10 minutos antes de serem

mergulhadas na fase líquida. O aparato utilizado permitiu essencialmente que o esperma fosse resfriado a 37 ° C/min de uma temperatura de -10 ° C para uma temperatura de -60 ° C. As amostras de esperma foram estocadas em nitrogênio líquido durante pelo menos 20 horas. As amostras foram descongeladas em um banho de água a 37 ° C e colocadas

5 para fora do canudo e para dentro de um prato petri BD Falcon standard de 35 x 10 mm (Fischer Scientific, USA). O esperma foi diluído a 1:50 em Cooks Mouse Vitro Fert (Cook's; Spencer, IN) e a mobilidade foi avaliada contando-se pelo menos cinco campos diferentes, utilizando-se um monitor de vídeo conectado a um microscópio utilizando uma ampliação de 40 x. Foram utilizados os seguintes valores: 0 para nenhuma mobilidade, + a
10 +++++ para a proporção de células móveis, com +++++ sendo a mais elevada. Em todos os casos testados, a adição de MTG produziu uma mobilidade aumentada com o CPM composto de lactose, glicerol, e gema de ovo, o MTG produzindo o melhor resultado.

Tabela 8: Análise de mobilidade de esperma de rato depois da crioconservação em uma quantidade de meios diferentes.

Composição do CPM			Resposta de mobilidade após descongelamento
Crioprotetor	Protetor de membrana	Removedor de radical livre	
8% de lactose	23% de gema de ovo		+
8% de lactose	23% de gema de ovo	477 μ M MTG	+
8% de lactose, 0,9M glicerol	23% de gema de ovo		++
8% de lactose, 0,9M glicerol	23% de gema de ovo	477 μ M MTG	++++
8% de lactose, 0,9M propileno glicol	23% de gema de ovo		0
8% de lactose, 0,9M propileno glicol	23% de gema de ovo	477 μ M MTG	+++

15 Exemplo 10: Crioconservação de esperma bovino

Foi recolhido sêmen através de uma vagina artificial de 6 touros Holstein diferentes em três dias diferentes. Os touros foram escolhidos de tal forma que três produziram esperma com qualidade boa e consistente de congelamento e três produziram o esperma que respondeu à crioconservação com uma consistência pior. Foram adicionados
20 antibióticos ao sêmen puro e o volume inicial e a concentração foram determinados utilizando-se um cilindro graduado e espectrofotometria. De cada conjunto, cinco porções

diferentes de 500 μ L de sêmen foram diluídos com 1,5 ml de de diluente de gema de ovo Triladil (Minitube; Verona, WI) contendo glicerol. Posteriormente 2 ml do mesmo diluído não contendo nenhum MTG, 200, 1000, 2000 ou 10.000 μ M de MTG foram adicionados no sêmen diluído para produzir a a concentração final de MTG de 0, 100, 500, 1000 ou 5000 μ M. Depois da diluição, o sêmen foi transferido para uma sala fria e foi resfriado até 4 ° C durante aproximadamente 1,5 horas. O diluído contendo a concentração apropriada de 1x de MTG foi adicionado a cada porção trazendo a concentração final de esperma para 80 x 10⁶/ml. Este sêmen adicionalmente diluído foi colocado em "French straws" 1/4CC utilizando-se carregadores automáticos (MRS4; IMV Technologies, Maple Grove, MN) e estocados a 4 ° C durante 3h. Após o período de tempo de equilíbrio, os canudos foram congelados em um congelador de temperatura controlada como se segue: 4 ° C/min até -12 ° C; 40 ° C/min até -100 ° C; 20 ° C/min até -140 ° C. As amostras foram transferidas para taças e estocadas em nitrogênio líquido até o exame.

Para o exame, foram descongelados seis canudos por tratamento por recolhimento em um banho de água a 37 ° C durante pelo menos 60 segundos. Para cada tratamento dentro de um recolhimento, foram criadas duas inoculações de sêmen e foram analisadas combinando-se os teores de três canudos. Em relação à mobilidade, as amostras de esperma foram diluídas a 1:3 em solução salina tamponada de fosfato (PBS) é manchadas com 100 μ g/ml do corante fluorescente de DNA da Hoechst 33342 antes de serem examinados utilizando-se o sistema ótico visual integrado Hamilton Thorne (IVOS). A percentagem de esperma móvel foi determinada em quatro campos diferentes dentro de cada um das duas câmaras separadas. Para a viabilidade, as amostras de esperma foram diluídas a 1:100 em PBS e manchadas com SYBR 14 (00 nM) e iodeto de propídio (12 μ M, cerca de 10.000 células foram contadas utilizando-se o citômetro de fluxo Partec Flomax (Ft. Collins, CO).

Resultados:

Mobilidade. Não foram detectadas diferenças de mobilidade entre os tratamentos. Esta não discrepância foi mantida mesmo depois de 3h de incubação. Da mesma forma, quando os touros foram agrupados com base nas suas características de congelamento de esperma, não foram detectadas diferenças na hora 0 ou 3. Estes resultados mostram que o CPM consistindo de glicerol, gema de ovo e MTG em várias concentrações não tem nenhum efeito prejudicial na mobilidade geral posterior ao descongelamento de esperma de touro.

Viabilidade. Conforme mostrado na figura 5C, a viabilidade total não foi influenciada negativamente pelo COM, que consistia de glicerol, gema de ovo e MTG, em várias concentrações. Quando os touros individuais foram analisados individualmente (FIGURA 5C) apareceram com evidência efeitos positivos.

A adição de MTG no meio de crioconservação resulta em um aumento da viabilidade

com um ligeiro efeito para os três touros e cerca de 8% de aumento para os outros três touros.

Exemplo 11: Crioconservação de sêmen humano

Foi recolhida uma amostra de sêmen para cada macho fértil, saudável, normal. Os
5 homens férteis são definidos como indivíduos com idade de 19 - 30 anos, que foram pais de
uma criança no prazo de até seis meses antes. Além disso, as amostras são consideradas
normais se elas atendem os parâmetros estabelecidos pelo critério WHO para a contagem,
mobilidade e morfologia de esperma. A amostra de sêmen é recolhida após um mínimo de
48 - 72h de abstinência sexual, mas não mais do que sete dias. O sêmen é obtido por
10 masturbação e ejaculação em um recipiente de plástico estéril com boca larga que foi
testado em relação à toxidez. O indivíduo é instruído para que sejam tomados cuidados para
a inclusão de todo o espécime no recipiente. Após o recebimento do ejaculado pelo
laboratório, cada amostra de sêmen é registrada em um livro de análise de sêmen. A
amostra de sêmen recebe um número de código de acesso consecutivo, o qual é registrado
15 juntamente com o nome do paciente e a data do recolhimento. A amostra do paciente é
identificada pelo número de código de acesso durante todo o procedimento de
congelamento; todos os tubos, slides, etc são marcados com este número. Enquanto a
amostra é liquefeita, o meio crioprotetor é preparado recentemente: TYB (Irvine Scientific,
cat # 90.128: 20% de gema de ovo - de flocos SPF (isentos de vírus) certificados pela
20 USDA, inativados termicamente a 56 °C durante trinta minutos; 12%,v/v, de glicerol; 10
 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de gentamicina) e 477 μM de MTG ou somente TYB. Para o controle é
utilizado o meio TYB sem MTG.

A amostra de sêmen é suavemente misturada com o meio crioprotetor preparado
recentemente em uma proporção de 1:1 e 0,25 ml de volume da mistura de
25 amostra/crioprotetor é transferida para cada um dos crio-frascos marcados (1 ml de Nunc).
Os crio-frascos são colocados em uma prateleira metálica e são colocados em suspensão
em vapor de LN2 no tanque de estocagem durante 12 minutos. Depois de 12 minutos, os
crio-frascos são colocados em um receptáculo de alumínio resfriado, marcado, e o
receptáculo é inserido na embalagem de papelão resfriada, marcada e colocada em um
30 receptáculo no tanque de estocagem. O sêmen crio- conservado será estocado durante pelo
menos 1 hora em nitrogênio líquido. Somente um frasco será descongelado colocando-se o
crio-frasco em um becher contendo água morna a 37 ° C durante 10 minutos. Então, a
amostra é suavemente misturada utilizando-se uma pipeta estéril. O sêmen é analisado em
relação à morfologia (por exemplo, acrosoma), mobilidade, progressão, viabilidade, e
35 contagem, imediatamente após o descongelamento. O teste de penetração de oócitos de
hamster isento de zona ou o ensaio de capacitação de clorotetraciclina podem ser
executados para se determinar a qualidade do sêmen.

Exemplo 12: Preparação e estocagem do meio crioprotetor

Aproximadamente 80 ml de água destilada e engarrafada (Invitrogen, cat # 15.230-238) foram colocados em um becher e aquecidos durante 40 segundos em um microondas de alta potência. Deve-se tomar cuidado para que não entre em ebulição. O becher foi colocado sobre uma placa aquecida de agitação e foram adicionadas 18 g de rafinose (Sigma, cat # R7630). A solução foi aquecida e agitada até ser clarificada. Posteriormente, foram adicionadas 3 g de leite desnatado (BD Diagnostics; cat # 232100) e a solução foi agitada até que o pó de leite desnatado foi dissolvido. A solução foi transferida para um frasco volumétrico e foi diluída com 100 ml de água destilada estéril (Invitrogen, cat # 15.230-238). Outra vez, a solução foi bem misturada e dividida em dois tubos de centrifuga de 50 ml. Para clarificar a solução, ela foi centrifugada a 13.000 X g durante 15 minutos na temperatura ambiente (22 ° C) e então foi filtrada através de um filtro de celulose de 0,22 μm e isto resultou em uma solução de 18% de rafinose / 3% de leite desnatado tendo uma osmolaridade final de 488 mOsm. Um terço desta solução foi suplementado com 477 μM de monotioglicerol (MTG; Sigma cat # M6145) e congelada a -80 ° C em um congelador Revco da série Elite® (Asheville, NC). Os outros dois terços foram congelados a -80 ° C sem nenhuma suplementação.

Depois de 8 semanas de estocagem a -80 ° C, as soluções de rafinose e leite desnatado foram descongeladas em um banho de água a 37 ° C até não ser mais observado nenhum precipitado (aproximadamente 1 hora). O primeiro meio crioprotetor consistia de 18% de rafinose, 3% de leite desnatado, 477 μM de MTG congelado durante 8 semanas (FROZEN MTG). O segundo meio crioprotetor consistia de 18% de rafinose e 3% de leite desnatado congelado durante 8 semanas sendo suplementado no momento do recolhimento de esperma com 477 μM de MTG fresco (FRESH MTG). O terceiro meio crioprotetor consistia de 18% de rafinose e 3% de leite desnatado que tinha sido congelado a -80 ° C durante 8 semanas (NENHUM MTG).

Dezoito machos C57BL/6J foram sacrificados e foram obtidos os seus "vas deferens" e epididimidas e o esperma foi isolado conforme descrito anteriormente (ver o exemplo 1). Nove grupos diferentes, cada um deles de dois machos, foram criados, e cada grupo foi indicado para ter o seu esperma recolhido em um de três meios crioprotetores diferentes. Isto resultou em serem coletados três grupos de machos para cada tratamento. Quatro porções, de 10 μL cada uma, foram colocadas em 10 "French straws" 1/4 CC (IMV; Maple Grove, MN; cat# AAA201). Estes foram então selados com um selante térmico instantâneo (modelo AIE-305HD; American Internatioanl Electric; Whittier, CA) e 5 dos mesmos foram colocados em um cassete (Zanders Medical Supplies; Vero Beach, FL). Os cassetes foram colocados sobre um flutuante dentro de uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido e as amostras foram expostas ao vapor de LN2 durante pelo menos 10 minutos antes de

serem mergulhadas na fase líquida. Isto permitiu que o esperma fosse resfriado a 37 ° C/min de uma temperatura de -10 ° C até uma temperatura de -60 ° C. As amostras de esperma foram estocadas em nitrogênio líquido durante aproximadamente 3 meses.

5 Para se determinar se a estocagem do meio crioprotetor a -80 ° C alterou a atividade do esperma de camundongos C57BL/6J, foram executadas fertilizações in vitro (IVF) conforme descrito anteriormente (ver o exemplo 1, ver também as publicações de Nakagata, 2000a; Nakagata, 2000b, Sztejn et al., 2000; Byers et al., 2006). Em resumo, o esperma e os oócitos, ambos de camundongos C57BL/6J, foram incubados em conjunto durante 4h em um incubador com tampa a 37 ° C. Depois de 4h de incubação conjunta os zigotos
10 presumidos foram lavados através de duas soluções de 150 µL de meio IVF (MVF; Cook's; Spencer, IN) e então culturados durante a noite. Aproximadamente 16h mais tarde, a proporção de oócitos fertilizados foi calculada dividindo-se o número de embriões de duas células pela soma de duas células e dos oócitos presumidos de uma célula, de aparição normal.

15 A figura 6 demonstra claramente que a estocagem do meio crioprotetor com MTG durante 2 meses a -80 ° C tem um desempenho igual, comparado com o meio crioprotetor com MTG adicionado recentemente. A coluna FROZEN MTG mostra que a taxa de fertilização com o esperma C57BL/6J foi crioconservada com o meio completo sendo estocado a -80 ° C. A coluna FRESH MTG mostra a taxa de fertilização quando o esperma
20 de C57BL/6J foi crioconservado com o meio sendo estocado a -80 ° C, mas com o MTG sendo adicionado recentemente. A coluna NO MTG mostra a taxa de fertilização quando o esperma de C57BL/6J foi crio- conservado com o meio sendo estocado a -80 ° C, mas que não continha MTG fresco. As diferenças nas percentagens de oócitos que desenvolveram duas células entre os tratamentos foram determinadas utilizando-se análise de variância em
25 percentagens transformadas no arcoseno e em comparações para todos os pares de médias utilizando-se a análise estatística Tukey-Kramer HSD (JMP; SAS Institute, Cary, NC). Aqueles meios com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05). Para a apresentação, são mostrados os desvios médio e standard das percentagens. Não pôde ser observada nenhuma diferença significativa entre as duas preparações de meios FROZEN
30 MTG e FRESH MTG.

Exemplo 13: Identificação de um varredor de radical livre adequado

Um varredor de radical livre adequado (útil para a crio- conservação de esperma) pode ser identificado testando-se uma ou mais das seguintes atividades (a) capacidade para a redução de espécies de oxigênio reativo (ROS), (b) efeito sobre a mobilidade do esperma
35 e (c) efeito sobre a fertilização in vitro (IVF). Naquelas circunstâncias nas quais é identificado um removedor de radical livre adequado para uso como esperma de camundongos, (a) e (c) são avaliados e executados. Para o esperma bovino, são

executados (a) e (b). Em cada caso, pode ser executada a terceira atividade ((b) para camundongos e (c) para bovino). Em realizações específicas, uma das (b) ou (c) acima serão testadas, além da (a) acima.

5 Por exemplo, a capacidade de redução de ROS pode ser testada por um método de corante/esperma conforme descrito no exemplo 4 e ver também as publicações por Nelid et al, 2006, e Guthrie e Welch, 2006. O esperma fresco ou crioconservado pode ser utilizado neste ensaio. Por exemplo, o esperma coletado de vas deferens e epididimis de dois camundongos C57BL/6J em 1 ml de uma solução contendo 3% de leite desnatado (peso/volume; BD Diagnostics; cat # 232100) e 18% de rafinose (peso/volume; Sigma; cat #
10 R7630). Uma fração do esperma recolhido foi diluída a 1:1 na mesma solução de rafinose e leite desnatado enquanto que a outra fração foi diluída a 1:1 utilizando-se a solução de rafinose e leite desnatado suplementada com 954 mM de monotioglicerol (MTG; Sigma Aldrich; cat # M6145). Outro conjunto de machos C57BL/6J foi utilizado para o recolhimento de esperma e a diluição na solução de rafinose e leite desnatado com 1 mM de glutathione
15 (GSH; Sigma Aldrich; cat # G6013) ou 2mM de ditionitrosol (DTT; Sigma Aldrich; cat # 646563). O esperma foi crio- conservado conforme descrito no exemplo 1 e estocado em nitrogênio líquido durante pelo menos 24 horas.

Para se determinar se o MTG, GSH ou o DTT podem agir como um removedor de radical livre, o esperma foi congelado e carregado com o corante fluorescente verde 5-(e 6-)-
20 clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM-H2DCFDA; Invitrogen C6827). Este corante é um indicador penetrante de célula para espécies de oxigênio reativo que é não fluorescente até a remoção dos grupos acetato, através de esterase intracelular e a oxidação ocorre dentro da célula. A emissão de fluorescência é correlacionada com a geração de ROS como resultado da oxidação DCFH. Para carregar o esperma, pelo menos
25 150 μ L de esperma foram descongelados e diluídos a 1:1 em um meio de incubação de esperma descrito por Bath et al. ((Bath 2003); 123 mM de NaCl; 4,7 mM de KCl; 0,2 mM de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 10 mM de $NaHCO_3$, 21 mM de HEPES; 0,33 mM de piruvato de sódio; 4,6 mM de glicose; 100 IU/ ml de penicilina G; 1,33 mg/ml de BSA). O corante liofilizado foi colocado em suspensão em dimetilsulfóxido até uma concentração de 432,5 μ M e então
30 adicionado nas células, de tal forma que a concentração final do corante era de 40 μ M. O esperma foi manchado durante 30 minutos e então 50 μ L das células foram colocadas em tubos (FACS) de armazenagem de células ativadas fluorescentes (tubos de 12 x 75 mm de poliestireno, Falcon # 2052 ou 2054 ou tubos de polipropileno, USA Plastics PN 1450-0000). Foram adicionados 500 μ l de meio de incubação de esperma contendo uma diluição de 50
35 vezes do agente de redução em potencial usado para o esperma crioconservado. Este nível de agente redutor foi escolhido para refletir a mesma diluição de 50 vezes observada durante a rotina da fertilização in vitro. Então, o esperma foi centrifugado durante 5 minutos

a 300xg, o sobrenadante foi decantado e as células foram recolocadas em suspensão em 100 μ L de meio de incubação de esperma contendo a diluição de 50 vezes do agente redutor em potencial apropriado. O esperma foi então testado com várias concentrações de terc-butil hidroperóxido (por exemplo, Sigma Aldrich; cat # B2633) para induzir o estresse oxidativo. As amostras estressadas foram incubadas durante 1 hora, diluídas a 300 μ L em meio de incubação de esperma suplementado com o agente redutor sendo investigado e então manchadas com 5 μ g/ml de iodeto de propidíneo (por exemplo, Invitrogen, cat # P-3566) e 5 μ g/ml de LDS-751 (Invitrogen, cat # L7595) para diferenciar as células vivas nucleadas e as mortas. As amostras foram carregadas em um citômetro de fluxo CFACScan (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ) ou FACSCalibur(BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ) e a fluorescência verde foi medida em cerca de 5000 espermatozoides viáveis. As figuras 7A e 7B mostram que todos os aditivos testados nesta experiência reduziram o nível de espécies de oxigênio reativo dentro das células de esperma de camundongo crioconservado.

As figuras 7A e 7B mostram resultados dos seguintes: o esperma de C57BL/6J crioconservado na presença e na ausência de três removedores de radical livre em potencial (monotioglicerol (MTG); ditioneitol (DTT); glutathione (GSH)) foram carregados com o corante fluorescente verde CM-H2DCFFDA para medir as espécies de oxigênio reativo intracelular (ROS). O esperma foi testado com vários níveis de terc-butil hidroperóxido para induzir o estresse oxidativo e a fluorescência verde foi medida utilizando-se a citometria de fluxo (A) FACSCalibur e (B) FACScan. Conforme mostrado, os agentes redutores em potencial limitaram o nível do ROS dentro do esperma de camundongos crioconservado. O eixo y mostra a fluorescência relativa sendo a mais elevada quando não está presente nenhum removedor de radical livre (linha sólida) e o eixo x mostra a concentração de terc-butil hidroperóxido.

Se o composto é capaz de reduzir o ROS na concentração testada, então é testado o seu efeito sobre a mobilidade e a fertilização do esperma. Embora o ensaio de mobilidade de esperma seja uma ferramenta rápida e útil para a seleção no caso dos camundongos, este ensaio não é requerido para camundongos e pode ser executado somente o ensaio IVF no caso dos camundongos. Para outras espécies, por exemplo, bovino, o ensaio de mobilidade de esperma juntamente com o ensaio de fluorescência é suficiente. O ensaio de mobilidade de esperma pode ser feito com o esperma fresco ou o crioconservado. Por exemplo, a mobilidade pode ser determinada conforme descrito no exemplo 6 (Determinação de concentração e mobilidade de esperma) utilizando-se um instrumento IVOS. Em resumo, o esperma de C57BL/6J foi diluído a 1:50 no "mouse vitro fert" previamente aquecido e gaseificado (Cook's; Spencer, IN) em óleo mineral leve. As amostras foram incubadas durante 1h a 37 ° C, em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de nitrogênio, em um incubador com tampa K-MINC-1000 (Cook's;

Spencer, IN). Depois da incubação, o esperma foi colocado em tubos de 0,1 x 2,0 mM de D.I. (VitroCom Inc. Mt Lks. N.J.) utilizando-se a ação capilar e três campos escolhidos manualmente por amostra foram analisados em relação à mobilidade, utilizando-se o sistema ótico visual integrado Hamilton Thorn (Beverly, MA) para a análise computadorizada do sêmen. Os solicitantes mostraram que o esperma congelado em CPM não contendo nenhum removedor de radical livre, 0,477 mM de MTG, 0,1 mM de DTT, 1 mM de DTT, 5 mM de DTT, 20 mM de DTT, 0,5 mM de GSH, 1 mM de GSH, 5 mM de GSH ou 50 mM de GSH podem ser avaliados em relação à mobilidade e aquela mobilidade de pelo menos 5% é requerida para se conseguir a fertilização no IVF. Todas as medições foram feitas em triplicata e a média é listada na tabela 9.

Tabela 9: Mobilidade do esperma de C57BL/6J depois de tratamentos diferentes com COM

Removedor de radical livre	Mobilidade média após descongelamento	Adequação de IVF
Nenhum	10-29%	sim
0,1 mM de DTT	24,6%	sim
1 mM de DTT	34%	sim
5 mM de DTT	17,6%	sim
20 mM de DTT	1,6%	não
0,5 mM de GSH	32%	sim
1 mM de GSH	25,3%	sim
5 mM de GSH	41,67%	sim
50 mM de GSH	0,6%	não
0,477 mM de MTG	16%	sim

Se o composto passou no teste de esperma/corante e no teste de mobilidade, então o seu efeito sobre o IVF é testado. O IVF foi executado conforme descrito no exemplo 1, com o esperma de C57BL/6J crioconservado no meio contendo como o removedor de radical livre, DTT, GSH ou MTG.

Tabela 10: Fertilidade do esperma de C57BL/6J depois de tratamentos diferentes com CPM

Removedor de radical livre	Taxa de fertilização (embriões de 2 células do total de oócitos)
Nenhum	31,2% (56 de 179)
0,1 mM de DTT	19,2% (33 de 169)
1 mM de DTT	2%(2 de 94)
5 mM de DTT	0,9% (2 de 212)

20 mM de DTT	6,4% (11 de 147)
0,5 mM de GSH	59,7% (138 de 229)
1 mM de GSH	49,5% (99 de 202)
5 mM de GSH	39,9% (74 de 195)
50 mM de GSH	0,0% (0 de 249)
477 mM de MTG	75,2% (111 de 149)

Estes dados mostram claramente que o esperma com uma mobilidade abaixo de 5% está comprometido e tem menos habilidade de fertilizar oócitos (20 mM de DTT e 50 mM de GSH). Além disso, estes dados mostram que, além do critério de esperma móvel, a taxa de fertilização resulta em um ensaio confiável para a determinação da eficiência do composto e da sua dose.

Exemplo 14: Crioconservação de espermatozóides de camundongos com CPM contendo um crioprotetor e um removedor de radical livre (CP-FRS).

Os epididimidas e vas deferentia são extraídos de 3 machos C57BL/6J e colocados no meio crioprotetor descrito aqui. O esperma é extraído e colocado em uma solução incubada de recolhimento de 1 ml do meio crioprotetor (CPM), que é composto, por exemplo, de rafinose [18%, peso/volume] e monotioglicerol [MTG: 100 μ M a 1 mM] ou de rafinose [18%, peso/volume] e glutatona reduzida [GSH; 500 μ M a 50 mM]). Neste exemplo, os solicitantes utilizaram 18%, peso/volume, de rafinose e 477 μ M de monotioglicerol. O esperma foi permitido nadar para dentro do CPM; e isto foi permitido durante pelo menos 5 minutos, mas menos de 20 minutos. Os tecidos residuais foram então removidos da solução de recolhimento. Dez μ L da amostra de esperma são colocados em tantos quantos uma centena de "French straws" de 250 μ L (IMV; Maple Grove, MN). Quatro porções de dez μ L do esperma recolhido foram colocadas dentro dos canudos, os quais foram selados com um selante térmico instantâneo. Os canudos foram colocados em cassetes e expostos ao vapor de nitrogênio líquido durante 10 minutos. Isto resfriou essencialmente o esperma a 37 ° C/min. Depois de ser estocado em nitrogênio líquido durante pelo menos 24 horas, seis amostras de cada tratamento foram descongeladas em um banho de água a 37 ° C durante 30 segundos, e então cada porção de 10 μ L foi colocada diretamente na sua própria solução de fertilização in vitro (IVF) de 500 μ L de Cooks Mouse Vitro Fert (Cook Australia; Queensland, Australia; Quinn et al., 1995). Depois de 1h de incubação, 4 aglomerados de oócitos intactos e acumulados de fêmeas superovuladas de C57BL/6J foram adicionados na solução de fertilização in vitro (ver o exemplo 1 e também Nakagata, 2000a; Nakagata 2000b, Sztein et al. 2000; Byers et al., 2006).

Em resumo, o esperma e os oócitos, ambos de camundongos C57BL/6J, foram incubados em conjunto durante 4h em um incubador com tampa a 37 ° C. Depois de 4h de

incubação conjunta, os zigotos presumidos foram lavados através de duas soluções de 150 μ L do meio IVF (MVF; Cook's; Spencer, IN) e então cultivados durante a noite. Aproximadamente 18h mais tarde, a proporção de oócitos fertilizados foi calculada dividindo-se o número de embriões de duas células pela soma dos duas células e dos oócitos de uma célula presumíveis de aparição normal.

Tabela 1: Animais para os quais foi utilizada a invenção atual

Categoria	Exemplos, mas não limitados a:	Notas
Linhas de camundongos da mesma origem	C3H CBA DBA FVB NOD BALB/c 129 C57BL	
Camundongos C57BL	C57BL/6J, C57BL/6NTac, C57BL/6NCrI, C57BL/10	www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml
Todas as outras famílias de camundongos da mesma origem, incluindo famílias da mesma origem recombinante	129S1/SvImJ, 129T2/SvEmsJ, 129X1/SvJ, 129P3/J, A/J, AKR/J, BALB/cBy, BALB/cByJ, BALB/cBALB/cJ, C3H/HeJ, C3H/HeOuj, C3HeB/FeJ, C57BL/10J, C58, CBA/CaHN-Btkid/J, CBA/J, DBA/1J, DBA/1LacJ, DBA/2J, FVB/NJ, MRL/MpJ, NOD/LJ, SJL/J, SWR/J, NOR/LJ, 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, C.B-17/lcrCrIBR, 129/SvPaslcoCrIBR, SJL/JordlcoCrIBR, 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,	Definição: camundongos de cruzamento da mesma espécie são geneticamente homogêneos e homocigotos em todas as partes. O "International Committee on Standardized Nomenclature for Mice" determinou que uma família de camundongos pode ser considerada "de cruzamento da mesma espécie" na geração F ₂₀

	<p>FVB/NhanHsd, MRL/MpOlaHsd, NZB/OlaHsd, NZW/OlaHsd, SWR/OlaHsd, 129P2/OlaHsd, e 129S2/SvHsd. B6.129P2-Apoetm1Unc/J NOD.CB17-Prkdcscid/J 129S1/SvimJ 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-#10tm1Cgn/J B6.129P2-Nos2tm1Lau/J B6.129P2-Nos3tm1Unc/J B6.129S2-Cd8atm1Mak/J B6.129S2-Igh-6tm1Cgn/J B6.129S7-Ifngtm1Ts/J B6.129S7-Rag1tm1Mom/J B6.CB17-Prkdcscid/SzJ B6.MRL-Faspr/J B6.V-Lepob/J BKS.Cg-m +/- Leprdb/J C3HeB/FeJ C57BL/10J C57BL/10SnJ C57BL/6-Tg(APOA1)1Rub/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-Faspr/J SjL/J SWR/J B10.PL-H2u H2-T18a/(73NS)SnJ NONcNZO5/LJ WR BPH/2 BPL/1 FS P/J P/A PRO</p>	
<p>Todas as mutações geneticamente engenheiradas (por exemplo, transgênicos, nocaute, "knockin", "knockdown", retrovirais, virais) induzidas quimicamente (por exemplo, ENO, EMS,</p>	<p>Exemplos: B6, 129 P2-Apoetm1Unc/J, B6.129S4-Pdyn^{tm1U/B}/J; B6; 129P2-Pem^t ^{tm1J}/J, B6; 129P2-Pem^{tm1J}/J, NOD.Cg Prkdc^{scid}- B2m^b/Dvs,</p>	

<p>também incluindo arquivos de mutantes); mutações induzidas por radiação; mutações/modificações espontâneas mantidas em famílias de camundongos, como por exemplo: C57BL7, 129, FVB, C3H, NOD, DBA/2, BALB/c, CD-1, incluindo famílias congênicas e famílias congênicas recombinantes</p>		
<p>Famílias híbridas de camundongos produzidas pelo cruzamento de duas famílias da mesma origem, incluindo famílias da mesma origem misturadas</p>	<p>Camundongos: NZBWF1/J B6CBAF1/J B6SJLF1/J CB6F1/J CBYB6F1/J PLSJLF1/J WBB6F1/J-KiW/KiW-v B6129PF1/J CAF1/J B6129PF2/J B6129SF1/J B6129SF2/J B6AF1/J B6C3F1/J B6CBAF1/J B6SJLF1/J</p> <p>(incluindo qualquer outra combinação) As proporções variam de 50:50 F1 a 99:1</p>	
<p>Camundongos de cruzamento de origens diferentes</p>	<p>CD-1; ICR; Black Swiss; Swiss Webster; NIH Swiss; CF-1. Nude</p>	<p>Definição de geração de espécies diferentes: Animais de uma população definida que são produzidos por esquemas de cruzamento que evitam cruzamentos entre indivíduos com descendência próxima para manter o nível máximo de heterozigosidade em todos os nascimentos.</p>

Cruzamento de ratos de origens diferentes	ACI, Brown Norway (BN), BC1X, Copenhagen (COP), MWF, D Agouti (DA), Goto-Kakizaki (GK), Lewis, Fischer 344 (F344), Wistar Furth (Wistar Kyoto (WKY; WKYN1), ZDF	
Todas as mutações geneticamente engenheiradas (por exemplo, transgênicos, nocaute, "knockin", "knockdown", retrovirais, virais) induzidas quimicamente (por exemplo, ENU, também incluindo arquivos de mutantes); mutações induzidas por radiação; mutações/modificações espontâneas mantidas em famílias de ratos, incluindo famílias congênicas	F344/NTac-Tg(HLA-B27)-Tg(2M)333Trg; HsdAmc:TR-Abcc2; HsdHlr:ZUCKER-Leprfa; NIH Nude	
Ratos híbridos produzidos pelo cruzamento de duas famílias da mesma espécie	BHR FBNF1/Hsd LBNF1/Hsd	Definição de geração de espécies diferentes: Animais de uma população definida que são produzidos por esquemas de cruzamento que evitam cruzamentos entre indivíduos com descendência próxima para manter o nível máximo de heterozigosidade em todos os nascimentos.
Ratos de cruzamento de espécies diferentes	Holtzman, Sprague Dawley, Long Evans, Wistar, Wistar Han, WH, Zucker, JCR (Russel Rat), OFA	
Todas as mutações geneticamente engenheiradas (por exemplo, transgênicos, nocaute,	coelhos, gansos, ovelhas, porcos, vacas, cavalos, cachorros, gatos,	

<p>"knockin", "knockdown", retrovirais, virais) induzidas quimicamente (por exemplo , ENO, também incluindo arquivos de mutantes); mutações induzidas por radiação; mutações/modificações espontâneas mantidas em mamíferos</p>		
<p>Outros roedores</p>	<p>gerbils, porcos da Guiné, hamsters, rato do algodão</p>	
<p>Todas as mutações geneticamente engenheiradas (por exemplo, transgênicos, nocaute, "knockin", "knockdown", retrovirais, virais) induzidas quimicamente (por exemplo , ENO, também incluindo arquivos de mutantes); mutações induzidas por radiação; mutações/modificações espontâneas mantidas em vertebrados.</p>	<p>Peixes (por exemplo, zebrafish, medaka, salmão, tilapia, lampreia, atum); galinha, peru</p>	
<p>Vacas</p>	<p>populações de cruzamento de espécies diferentes ou aleatórias</p>	
<p>Porcos</p>	<p>populações de cruzamento de</p>	

	espécies diferentes ou aleatórias	
Gansos	populações de cruzamento de espécies diferentes ou aleatórias	
Ovelhas	populações de cruzamento de espécies diferentes ou aleatórias	
Cavalos	populações de cruzamento de espécies diferentes ou aleatórias	
Seres humanos	populações de cruzamento de espécies diferentes ou aleatórias	
Todos os outros mamíferos Outros vertebrados	<p>cachorros, gatos, camelos, primatas não humanos, todas as populações de cruzamento de espécies diferente ou aleatórias, animais de zoológico, marsupiais, mamíferos em risco de extermínio, peixe de água doce (por exemplo, carpas, siluroides, salmonóide, tilapia medaka, zebrafish)</p> <p>Peixes marinhos (por exemplo, arenque, enguia, perca do mar, linguado, garoupa, peixe-porco, truta marrom, "drums", "croaker", "weakfish", golfinho, cavalas, atum, tartaruga, peixe-espada, garopa, peixe azul, flexa, peixe de bico, camurupim, peixes tropicais); peixes com risco de extermínio</p> <p>Pássaros (galo, peru, pato, ganso, "quail", faisão, galinha de Angola, pinguim, pássaros de companhia, pássaros com risco de extermínio,</p>	

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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).
- 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.
- 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.
- 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.
- NAKAGATA, "Cryopreservation of mouse spermatozoa," (2000a), *Mammalian Genome* 11, 572-576.
- NAKAGATA, "Mouse Spermatozoa Cryopreservation," (2000b), *J Mamm Ova Res* 17, 1-8.
- NEILD DM, Brouwers JF, Colenbrander B, Aguero A, Gadella BM (2005). Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev.*72(2):230-8.
- GUTHRIE HD, Welch GR (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.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para preservação criogênica de esperma, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende pelo menos um crioprotetor, pelo menos uma membrana protetora e pelo menos um varredor de radical livre.

5 2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o crioprotetor é açúcar.

 3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o crioprotetor é selecionado do grupo que consiste de: rafinose, lactose, trealose, melibiose, melezitose, manotriose, estaquiase, dextrana, hidróxi-etil amido, sucrose, maltitol, lactitol, glicerol e outros álcoois de açúcar.

 4. Composição, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o açúcar é rafinose ou lactose.

 5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o crioprotetor é selecionado do grupo que consiste de polietilenoglicol, DMSO, etilenoglicol, propilenoglicol, polivinil pirrolidona, glicerol e óxido de polietileno.

 6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a membrana protetora é uma proteína, uma não proteína ou uma combinação de uma proteína e uma não proteína.

 7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a membrana protetora é uma proteína selecionada do grupo que consiste de: caseína, albumina, queratina, colágeno, atelo-colágeno, elastina, gelatina, peptonas, fibrinogênio, fibronectina, proteína de ovo, proteína de gema de ovo, proteína de clara de ovo, uma proteína de soja, uma proteína de trigo, uma proteína de milho, um hidrossilato destes e uma combinação destes.

 8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a membrana protetora é leite desnatado ou um componente deste, leite em pó ou um componente deste ou gema de ovo ou um componente desta.

 9. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a membrana protetora é selecionada do grupo que consiste de um lipídeo, um lipídeo quimicamente sintetizado e um lipídeo sintético, fosfatodilglicerol, ácido fosfatídico, 1,1',2,2'-tetra-acil-cardiolipina, fosfatodilcolina, fosfatodilserina, fosfatodiletanolamina, um lipídeo à base de polioxietileno, ácido linoléico araquidônico, ácido linoléico, ácido mirístico, ácido oléico, ácido palmítico ou ácidos graxos esteáricos, colesterol, F-68 Plurônico, álcool polivinílico e combinações destes.

 10. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o varredor de radical livre é um agente redutor.

 11. Composição, de acordo com a reivindicação 10, **CHARACTERIZADA** pelo fato

de que o agente varredor de radical livre é um agente redutor selecionado do grupo que consiste de: monotioglicerol, beta-mercaptoglicerol, ditiotreitól, tris(2-carboxietil)fosfina, diti-
oeritritól, tioredoxina, ditionita, 2-mercaptoetilamina, dimetil tiouréia, DMSO, ácido nordihidro-
guaiairético (NDGA), 2,3-dimercapto-1-propanol ou hidroquinona.

5 12. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o varredor de radical livre é um antioxidante.

10 13. Composição, de acordo com a reivindicação 12, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o varredor de radical livre é um antioxidante selecionado do grupo que consiste de um aminoácido, um derivado de aminoácido, uma vitamina, um derivado de vitamina, hidro-
xianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido dihidrolípico, tetraidropapaverolina, ácido 2-
tiobarbitúrico ou taurina, ácido dimercaptosuccínico, alopurinol, deferoxamina, melatonina, catalase, peroxidase glutaciona, superóxido dismutase, esteróides, GSH e combinações destes.

15 14. Composição, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a concentração do açúcar na composição é de cerca de 10% peso/volume a cerca de 30% peso/volume.

15 15. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a concentração da membrana protetora é de cerca de 1% peso/volume a cerca de 50% peso/volume ou cerca de 1% volume/volume a cerca de 90% volume/volume.

20 16. Composição, de acordo com a reivindicação 10, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o agente redutor é monotioglicerol e a concentração do monotioglicerol é de cerca de 50µm a cerca de 50000µm.

25 17. Composição, de acordo com a reivindicação 12, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o antioxidante é glutaciona reduzida e a concentração da glutaciona reduzida é de cerca de 50µm a cerca de 50000µm.

18. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-18, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o esperma é isolado de um vertebrado.

19. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-18, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o esperma é isolado de um mamífero.

30 20. Composição, de acordo com a reivindicação 19, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o mamífero é um camundongo, um rato, um hamster, um porquinho da Índia, um gato, um cachorro, um bode, um cavalo, um gado, um camelo, um porco, um coelho, uma ovelha ou um humano.

35 21. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-20, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o esperma é isolado de um gado.

22. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-20, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o esperma é isolado de um roedor.

23. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o esperma é isolado de um rato.

24. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o esperma é selecionado de um camundongo.

5 25. Composição, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o camundongo é um camundongo de linhagem ou sub-linhagem endogâmica.

26. Composição, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a linhagem de camundongo endogâmica é selecionada de C57BL, BALB/c, FVB, 129, C3H, CBA, DBA e NOD.

10 27. Composição, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a sub-linhagem é selecionada de C57BL/6, BALB/c, FVB/N, 129X1/Sv e 129S1/SvIm.

28. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-27, **CARACTERIZADA** pelo fato de que adicionalmente compreende esperma.

15 29. Recipiente, **CARACTERIZADO** pelo fato de que contém a composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1-28.

20 30. Método de preservação criogênica do esperma, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionar ao esperma, antes da criopreservação, uma composição que compreende pelo menos um crioprotetor, pelo menos uma membrana protetora, e pelo menos um varredor de radical livre.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o crioprotetor é selecionado de um grupo que consiste de rafinose, lactose, trealose, melibiose, melezitose, mantriose, estaquiose, dextrana, sucrose, e álcoois de açúcar destes, glicerol, maltitol e lactitol.

25 32. Método, de acordo com a reivindicação 30 ou 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o crioprotetor é rafinose ou lactose.

30 33. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a membrana protetora é uma proteína selecionada de um grupo que consiste de proteína de ovo, proteína de gema de ovo, proteína de clara de ovo, caseína, albumina, queratina, colágeno, atelo-colágeno, elastina, gelatina, peptonas, fibrinogênio, fibrinonectina, uma proteína de soja, uma proteína de trigo, uma proteína de milho, uma proteína de leite, e hidrossilatos destes.

35 34. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a membrana protetora é leite desnatado ou um componente deste, leite em pó ou um componente deste ou gema de ovo ou um componente desta.

35 35. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o varredor de radical livre é um agente redutor ou um antioxidante.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o agente redutor é monotioglicerol.

37. Método, de acordo com a reivindicação 35, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o antioxidante é glutaciona reduzida ou ditionitrositol.

5 38. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração do açúcar é de cerca de 10% peso/volume a cerca de 30% peso/volume ou cerca de 10% volume/volume a cerca de 90% volume/volume.

10 39. Método, de acordo com a reivindicação 33, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração da proteína é de cerca de 1% peso/volume a cerca de 50% peso/volume ou de cerca de 1% volume/volume a cerca de 90% volume/volume.

40. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o varredor de radical livre é monotioglicerol e a concentração de monotioglicerol é de cerca de 50µm a cerca de 50000µm.

15 41. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o varredor de radical livre é glutaciona reduzida e a concentração de glutaciona reduzida é de cerca de 50µm a cerca de 50000µm.

42. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o esperma é isolado de um vertebrado.

20 43. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o esperma é isolado de um mamífero.

44. Método, de acordo com a reivindicação 43, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o mamífero é selecionado do grupo que consiste de: um camundongo, um rato, um hamster, um porquinho da Índia, um gato, um cachorro, um bode, um cavalo, um gado, um camelo, um porco, um coelho, uma ovelha ou um humano.

25 45. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o esperma é isolado de um animal de fazenda.

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o animal de fazenda é gado, um porco, um bode, um cavalo ou uma ovelha.

30 47. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o esperma é isolado de um animal de companhia.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o animal de companhia é um gato, um cachorro, um cavalo, um camelo, um pássaro ou um peixe.

35 49. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o esperma é isolado de um roedor.

50. Método, de acordo com a reivindicação 30 ou 49, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o esperma é isolado de um rato.

51. Método, de acordo com a reivindicação 30 ou 49, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o esperma é isolado de um camundongo.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o camundongo é um camundongo de linhagem ou sub-linhagem endogâmica.

5 53. Método, de acordo com a reivindicação 52, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a linhagem de camundongo endogâmica é selecionada de C57BL, BALB/c, FVB, 129, C3H, CBA, DBA e NOD.

54. Método, de acordo com a reivindicação 52, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a sub-linhagem é selecionada de C57BL/6, BALB/c, FVB/N, 129X1/Sv e 129S1/SvIm.

10 55. Método, de acordo com a reivindicação 31, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o açúcar é rafinose ou lactose, a proteína é proteína do leite, proteína no leite, proteína de ovo, proteína de gema de ovo ou proteína de clara de ovo e o varredor de radical livre é monotioglicerol.

15 56. Método de preservação criogênica do esperma, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionar ao esperma, antes da criopreservação, uma composição que compreende pelo menos um açúcar, pelo menos uma membrana protetora, e pelo menos um varredor de radical livre.

20 57. Método, de acordo com a reivindicação 56, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o açúcar é rafinose ou lactose; a membrana protetora é gema de ovo, leite desnatado, leite ou um componente deste e o varredor de radical livre é monotioglicerol, glutatona ou ditio-treitol.

58. Método de produção de esperma que tem maior capacidade de fertilização seguinte a preservação criogênica, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

25 (a) combinar o esperma com um composição, em que a composição compreende pelo menos um crioprotetor, pelo menos uma membrana protetora, e pelo menos um agente redutor, dessa maneira produzindo uma combinação;

(b) criopreservar a combinação, dessa maneira produzindo uma combinação criopreservada compreendendo esperma criopreservado;

30 59. Composição criogenicamente preservada, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende (a) esperma e (b) uma composição que consiste de um crioprotetor, uma membrana protetora que estabiliza ou auxilia na estabilização de membranas de esperma e um varredor de radical livre.

35 60. Composição criogenicamente preservada, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende (a) esperma e (b) uma composição para preservação criogênica do esperma, em que a composição consiste de pelo menos um crioprotetor, pelo menos uma membrana protetora, e pelo menos um varredor de radical livre que é um agente redutor ou um antioxidante.

61. Composição criogenicamente preservada, de acordo com a reivindicação 59 ou 60, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o esperma é esperma de roedor.

62. Composição criogenicamente preservada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-61, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o esperma é esperma de camundongo ou de rato.

63. Composição criogenicamente preservada, de acordo com a reivindicação 59, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o crioprotetor é rafinose, a membrana protetora é uma proteína de leite e o varredor de radical livre é monotioglicerol ou glutathione reduzida.

64. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 42-48, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vertebrado ou mamífero é um vertebrado geneticamente modificado ou um mamífero geneticamente modificado.

65. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 49-54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o roedor é um roedor geneticamente modificado.

66. Método, de acordo com a reivindicação 65, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o roedor geneticamente modificado é um camundongo geneticamente modificado ou um rato geneticamente modificado.

67. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56-58, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o esperma é esperma de um vertebrado geneticamente modificado.

68. Método, de acordo com a reivindicação 67, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vertebrado geneticamente modificado é um mamífero geneticamente modificado.

69. Composição criogenicamente preservada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-63, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o esperma é esperma de um vertebrado geneticamente modificado.

70. Composição criogenicamente preservada, de acordo com a reivindicação 69, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o vertebrado geneticamente modificado é um mamífero geneticamente modificado.

71. Composição criogenicamente preservada, de acordo com a reivindicação 68 ou 70, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o mamífero geneticamente modificado é um camundongo, rato, hamster, porquinho da Índia, gato, cachorro, bode, cavalo, gado, camelo, porco, coelho, ou ovelha geneticamente modificado.

72. Kit para uso na criopreservação de esperma, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende os seguintes componentes:

- (a) pelo menos um crioprotetor;
- (b) pelo menos um varredor de radical livre; e
- (c) pelo menos uma membrana protetora.

73. Kit, de acordo com a reivindicação 72, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o

pelo menos um varredor de radical livre foi identificado por um método de identificação de varredor de radical livre, compreendendo avaliar pelo menos uma das seguintes atividades de um candidato a varredor de radical livre:

(a) capacidade de reduzir as espécies reativas com oxigênio no esperma;

5 (b) efeito na mobilidade do esperma; e

(c) efeito na fertilização *in vitro*.

em que se o candidato a radical livre exibir um efeito benéfico em pelo menos uma dentre (a), (b), ou (c), o candidato a varredor de radical livre é um varredor de radical livre adequado para uso na criopreservação de esperma.

10 74. Kit, de acordo com a reivindicação 72 ou 73, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende:

(d) instruções para uso dos componentes do kit para preservar o esperma.

75. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72-74, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende um recipiente.

15 76. Kit, de acordo com a reivindicação 75, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o recipiente é uma caixa Styrofoam ou um recipiente isolado.

77. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72-74, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende um vaso criogênico.

20 78. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72-74, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende um receptáculo para esperma.

79. Kit, de acordo com a reivindicação 78, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que receptáculo é um canudo, uma ampola de vidro, um critotubo ou criofrasco.

80. Kit, de acordo com a reivindicação 73, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um agente crioprotetor é selecionado do grupo que consiste de rafinose, lactose, trealose, melibiose, melezitose, manotriose, estaquiase, dextrana, hidróxi-etil amido, sucrose, maltitol, lactitol, glicerol e combinações destes.

81. Kit, de acordo com a reivindicação 73, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um agente crioprotetor é selecionado do grupo que consiste de polietilenoglicol, DMSO, etilenoglicol, propilenoglicol, polivinil pirrolidona, óxido de polietileno, e combinações destes.

82. Kit, de acordo com a reivindicação 72, 73 ou 74, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a pelo menos uma membrana protetora é caseína, albumina, queratina, colágeno, atelo-colágeno, elastina, gelatina, peptonas, fibrinogênio, fibronectina, gema de ovo ou componente desta, uma proteína de soja, uma proteína de trigo, uma proteína de milho, leite, leite em pó, leite desnatado ou um componente deste, um hidrossilato de um dos anteriores e combinações destes.

83. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72-74, **CHARACTERIZADO**

5 pelo fato de que a pelo menos uma membrana protetora é selecionada do grupo consistindo de um lipídeo, um lipídeo quimicamente sintetizado, um lipídeo sintético, fosfatodilglicerol, ácido fosfatídico, 1,1',2,2'-tetra-acil-cardiolipina, fosfatodilcolina, fosfatodilserina, fosfatodiletanolamina, um lipídeo à base de polioxietileno, ácido linoléico araquidônico, ácido linoléico, ácido mirístico, ácido oléico, ácido palmítico ou ácidos graxos esteáricos, colesterol, F-68 Plurônico, álcool polivinílico e combinações destes.

84. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72-74, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um varredor de radical livre é um agente redutor.

10 85. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72-74, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um agente varredor de radical livre é selecionado do grupo consistindo de monotioglicerol, beta-mercaptoglicerol, ditioneitol, tris(2-carboxietil)fosfina, ditioeritritol, tioredoxina, ditionita, 2-mercaptoetilamina, dimetil tiouréia, DMSO, ácido nordiidroguaiarético (NDGA), 2,3-dimercapto-1-propanol, hidroquinona, e combinações destes.

15 86. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 84-85, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um agente redutor é monotioglicerol e a concentração do monotioglicerol é de cerca de 50 micromolar a cerca de 50000 micromolar.

87. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 72-74, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um varredor de radical livre é um antioxidante.

20 88. Kit, de acordo com a reivindicação 72, 73 ou 74, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pelo menos um varredor de radical livre é selecionado do grupo consistindo de um aminoácido, um derivado de aminoácido, uma vitamina, um derivado de vitamina, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido diidrolipóico, tetraidropapaverolina, ácido 2-tiobarbitúrico ou taurina, ácido dimercaptosuccínico, alopurinol, deferoxamina, melatonina, catalase, peroxidase glutaciona, superóxido dismutase, esteróides, GSH e combinações
25 destes.

89. Composição para uso na criopreservação de esperma, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição inclui:

(a) pelo menos um crioprotetor e

(b) pelo menos um varredor de radical livre,

30 em que a composição não inclui uma membrana protetora.

90. Método de preservação criogênica do esperma, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionar ao esperma, antes da criopreservação, uma composição que inclui pelo menos um crioprotetor e pelo menos um varredor de radical livre.

35 91. Método, de acordo com a reivindicação 90, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o crioprotetor é selecionado do grupo que consiste de rafinose, lactose, trealose, melibiose, melezitose, manotriose, estaquiase, dextrana, sucrose, e álcoois de açúcar destes, glicerol, maltitol e lactitol.

92. Método, de acordo com a reivindicação 90 ou 91, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o varredor de radical livre é um agente redutor ou um antioxidante.

93. Método, de acordo com a reivindicação 90, 91 ou 92, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o varredor de radical livre é monotioglicerol, GSH ou ditiotreitól.

5 94. Composição para uso na criopreservação de esperma, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que inclui pelo menos um varredor de radical livre.

95. Composição, de acordo com a reivindicação 94, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que ainda compreende pelo menos um dos seguintes: água, tampão, antibiótico, agente anti-viral ou um agente anti-bacteriano.

10 96. Método de preservação criogênica de esperma, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionar ao esperma, antes da criopreservação, uma composição que inclui pelo menos um varredor de radical livre.

97. Método, de acordo com a reivindicação 96, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o varredor de radical livre é um agente redutor ou um antioxidante.

15 98. Método, de acordo com a reivindicação 96 ou 97, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o varredor de radical livre é monotioglicerol, GSH ou ditiotreitól.

99. Método de identificação de um radical livre adequado para uso na criopreservação de esperma, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende avaliar pelo menos uma das seguintes atividades de um candidato a varredor de radical livre:

- 20 (a) capacidade de reduzir as espécies reativas com oxigênio no esperma;
(b) efeito na mobilidade do esperma; e
(c) efeito na fertilização *in vitro*.

em que se o candidato a radical livre exibir um efeito benéfico em pelo menos uma dentre (a)-(c), o candidato a varredor de radical livre é um varredor de radical livre.

25 100. Método, de acordo com a reivindicação 99, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o varredor de radical livre a ser identificado é um varredor de radical livre para uso na criopreservação de esperma de camundongo e pelo menos atividade (a) e atividade (c) são avaliadas.

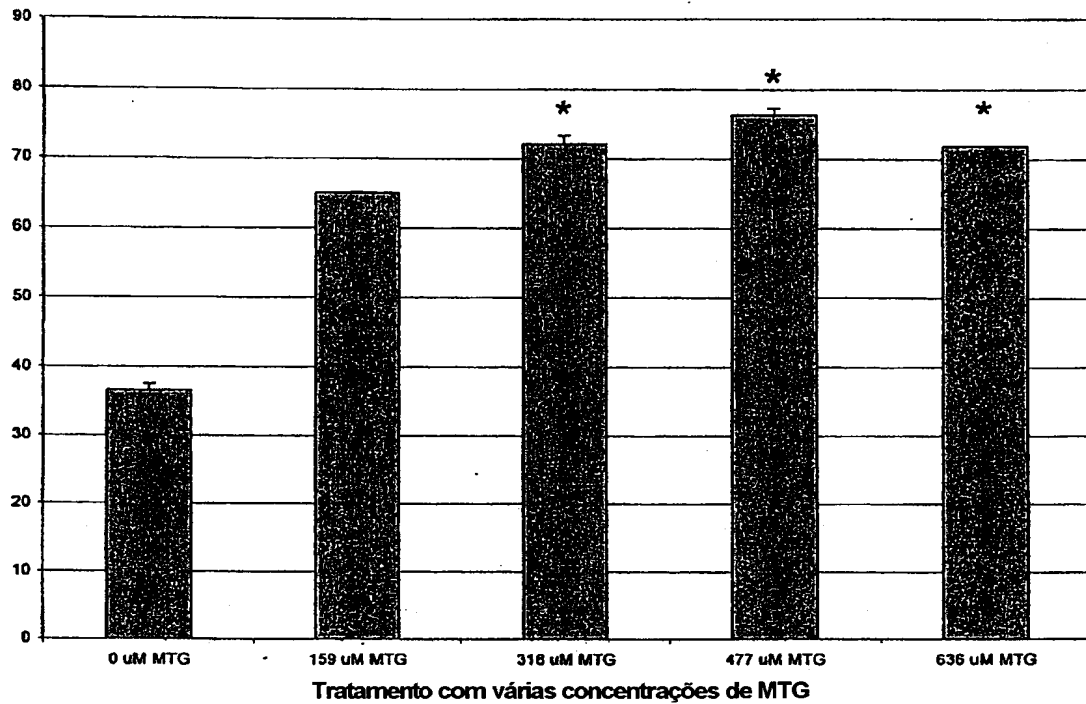
30 101. Método, de acordo com a reivindicação 99, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o varredor de radical livre a ser identificado é um varredor de radical livre para uso na criopreservação de esperma bovino e pelo menos atividade (a) e atividade (b) são avaliadas.

35 102. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 99-101, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a avaliação é conduzida usando um método corante/esperma, compreendendo incubar: (a) esperma carregado com um indicador permeável à célula (corante) para espécies reativas com oxigênio que é não fluorescente a não ser que a oxidação ocorra no esperma e (b) um candidato a varredor de radical livre, de maneira a

produzir uma combinação incubada e avaliar o nível das espécies reativas com oxigênio no esperma, em que se o nível de espécies reativas com oxigênio for reduzida, em relação ao nível de espécies reativas com oxigênio no esperma na ausência do candidato a varredor de radical livre, o candidato a varredor de radical livre é um varredor de radical livre adequado para uso na criopreservação de esperma.

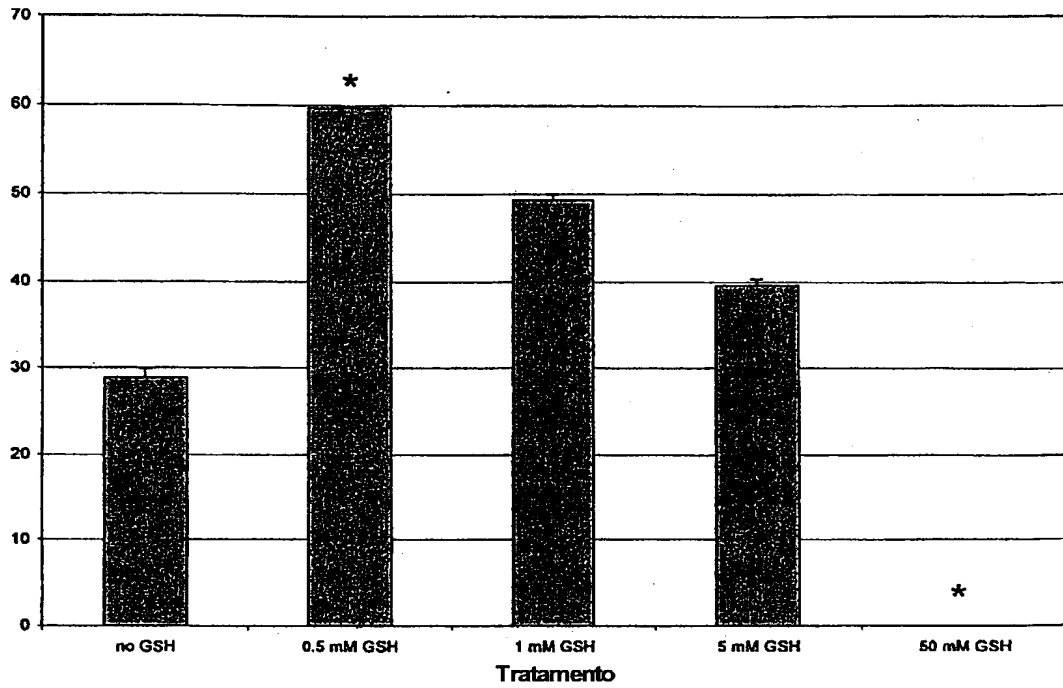
103. Método, de acordo com a reivindicação 102, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende avaliar (a) o efeito do varredor de radical livre na mobilidade do esperma; (b) o efeito do varredor de radical livre na fertilização *in vitro*; ou ambos (a) e (b).

FIGURA 1: Monotioglicerol aumenta a fertilidade de esperma C57BL/6J.



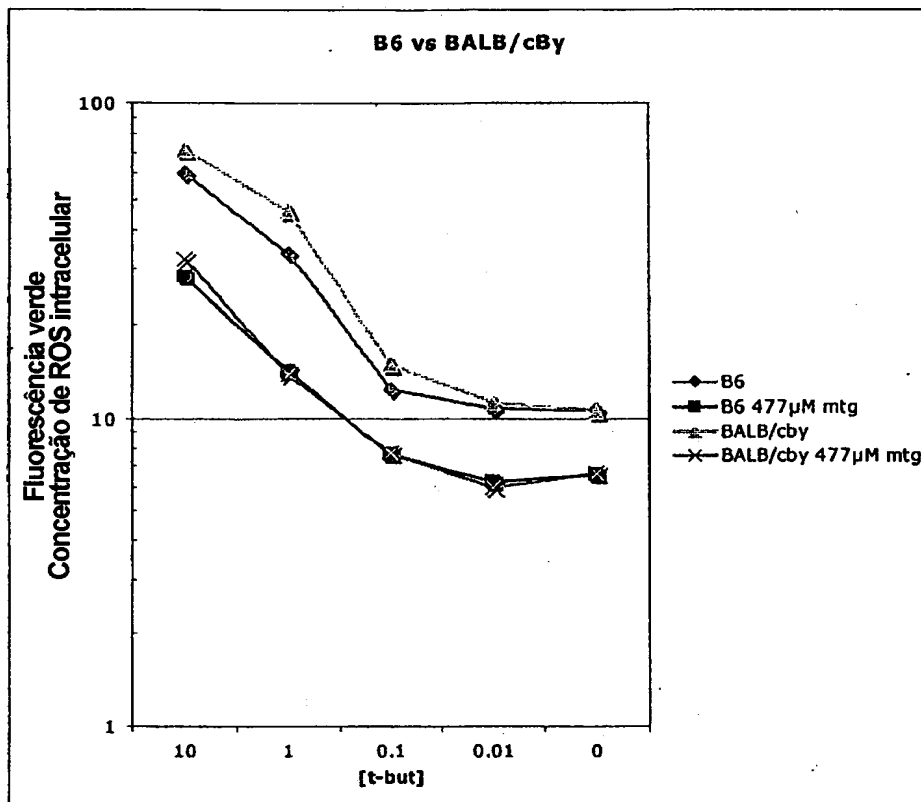
Legenda para o eixo x: Concentração do tratamento MTG

Legenda para o eixo y: % de oócitos em desenvolvimento em embriões de 2 células

FIGURA 2: GSH aumenta a fertilidade de espermatozoides C57BL/6J criopreservado

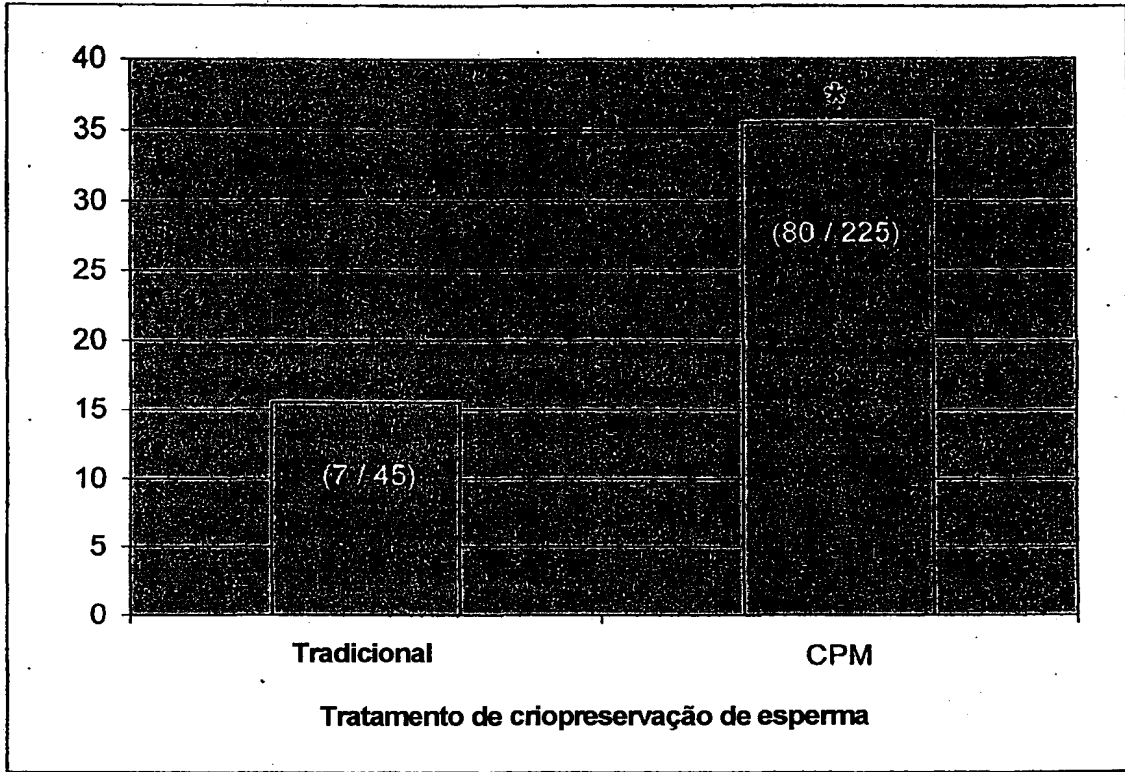
Legenda para eixo x: Concentração do tratamento de GSH;

Legenda para eixo y: % de óvulos em desenvolvimento para embriões de 2 células



Nesta figura C57BL/6J está abreviado como B6 e BALB/cByJ com BALB/cby.

FIGURA 3



% de embriões transferidos desenvolvidos até o fim

FIGURA 4

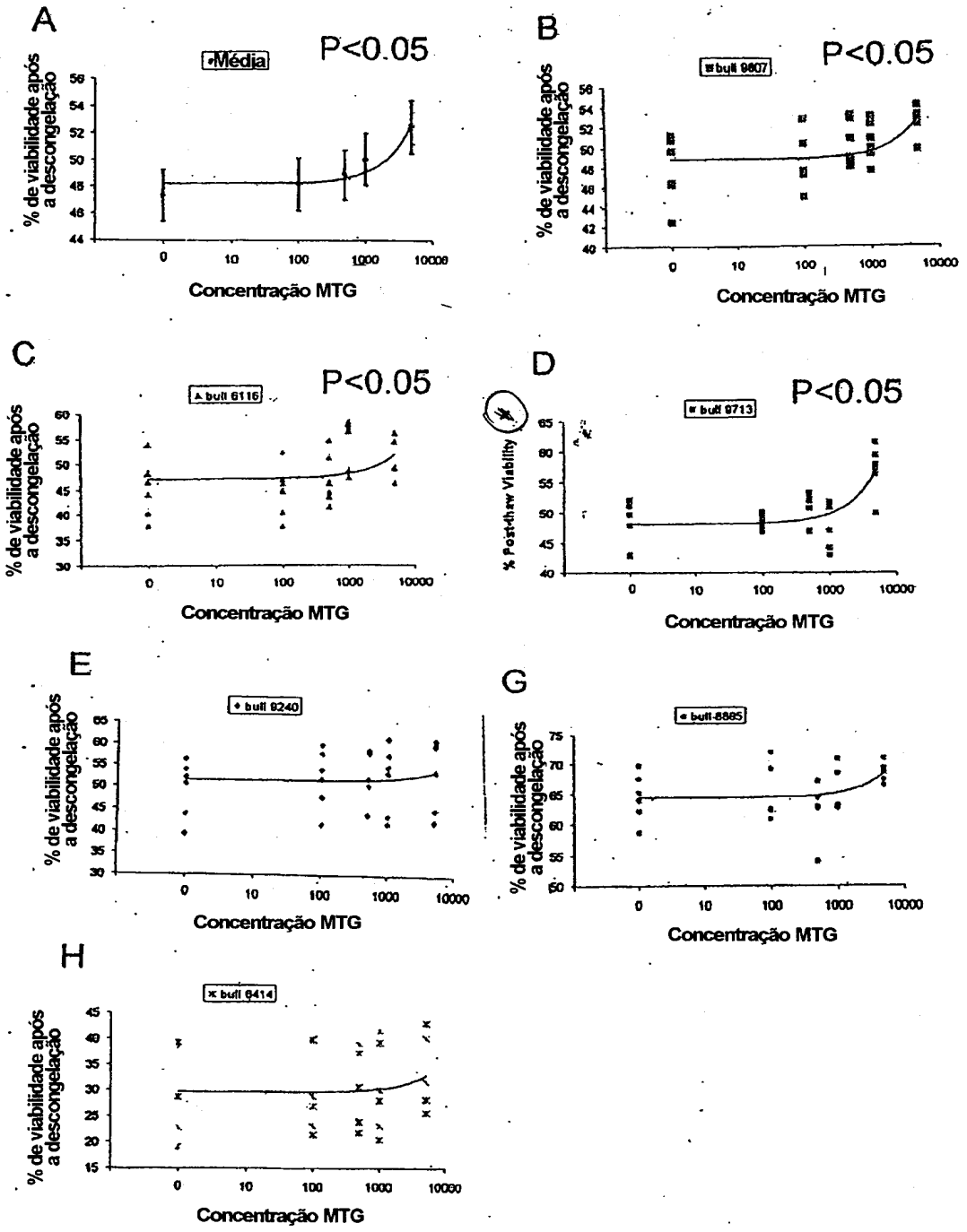


FIGURA 5

% de óocitos em desenvolvimento em embriões de 2 células

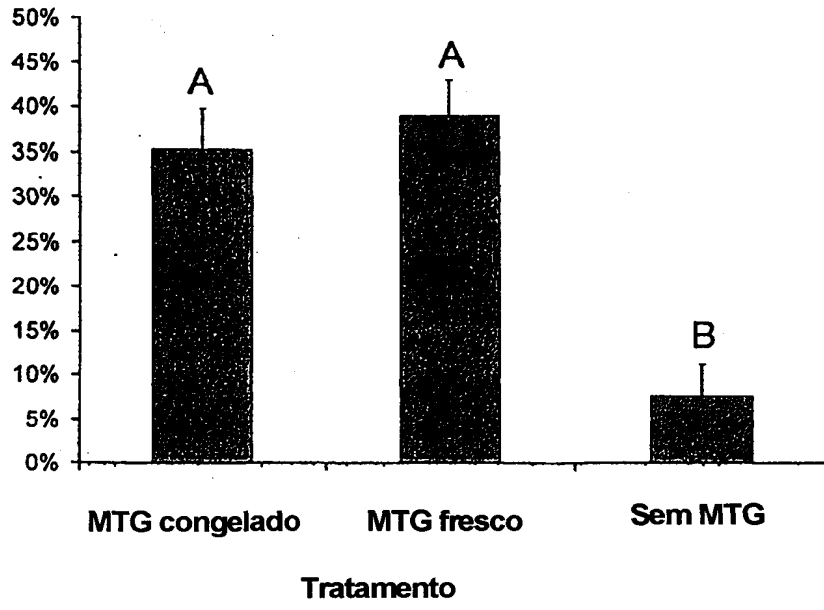


FIGURA 6

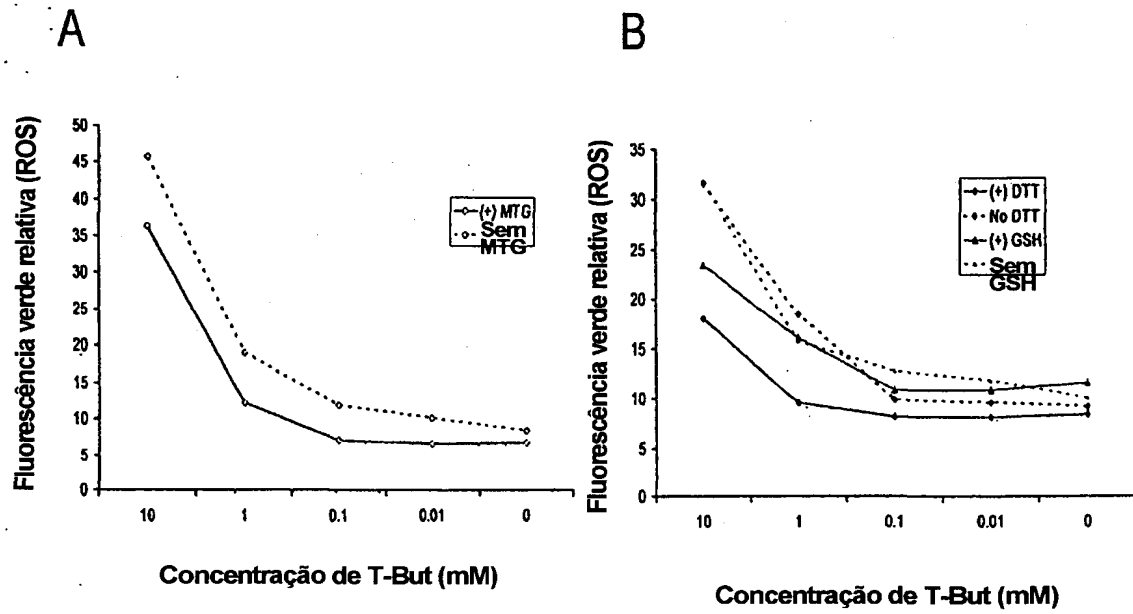


FIGURA 7

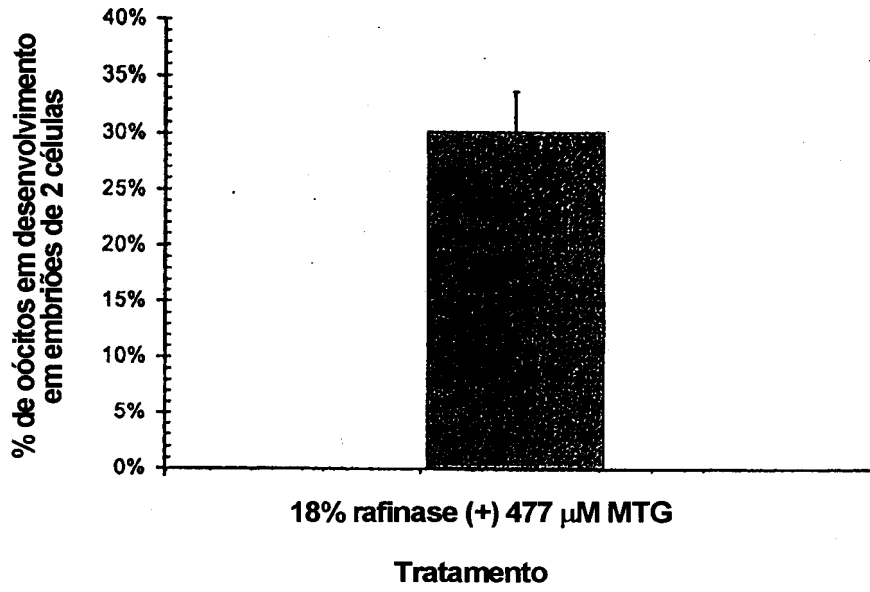


FIGURA 8

RESUMO

“MEMBRANA CRIOPROTETORA DE ESPERMA”

São descritas composições que compreendem um crioprotetor; uma membrana protetora que estabiliza ou auxilia na estabilização de membranas do esperma; e um varredor de radical livre (por exemplo, um agente redutor, um antioxidante).