(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
20 de septiembre de 2012
(20.09.2012)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/123606 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 5/07 (2010.01) *A01N 1/02* (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070135

(22) Fecha de presentación internacional:
2 de marzo de 2012 (02.03.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201130337 11 de marzo de 2011 (11.03.2011) ES

(71) Solicitantes *(para todos los Estados designados salvo US)*: **UNIVERSIDAD DE LEÓN** [ES/ES]; Avenida de la Facultad, 25, Edificio Rectorado, E-24071 León (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **ROBLES RODRÍGUEZ, Vanesa** [ES/ES]; Universidad de León, Avenida de la Facultad, 25, Edificio Rectorado, E-24071 León (ES). **MARTÍNEZ PASTOR, Felipe** [ES/ES]; Universidad de León, Avenida de la Facultad, 25, Edificio Rectorado, E-24071 León (ES). **VILLANUEVA LÓPEZ, Roger** [ES/ES]; Instituto de Ciencias del Mar (ICM), Passeig Maritim, 37-49, E-08003 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

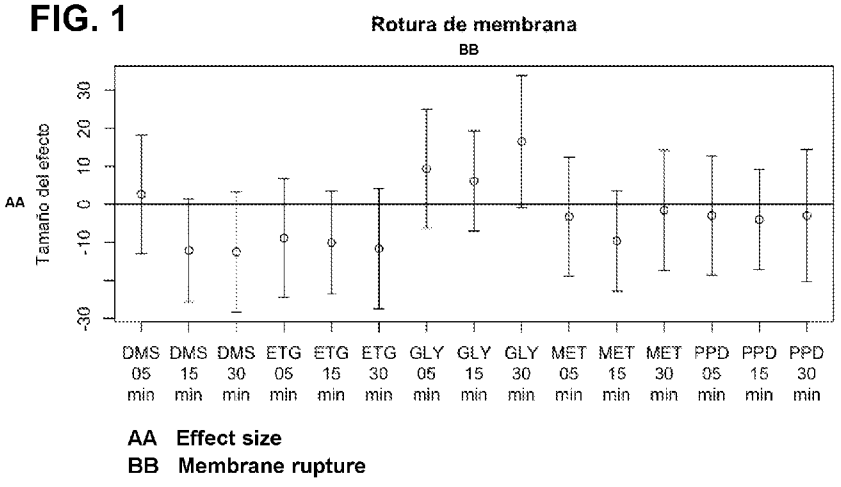
(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD OF PERMANENT PRESERVATION OF CEPHALOPOD SPERM

(54) Título : MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN INDEFINIDA DE ESPERMA DE CEFALÓPODOS

FIG. 1



(57) Abstract: The present invention claims a method for long-term preservation of cephalopod sperm by means of the cryopreservation of the spermatophores and spermatangia thereof. Cryopreservation is obtained by means of the use of optimum protocols for incorporation and elimination of permeable cryoprotectants (alcohols, sulphoxides and formamides in aqueous solution), and suitable freezing and thawing gradients. The method described herein is of great use in the rearing, in captivity, of cephalopod species of commercial interest, in the preservation of species in danger of extinction and in research for developing *in vitro* cephalopod fertilization techniques.

(57) Resumen: La presente invención reivindica un método de conservación a largo plazo del esperma de cefalópodos mediante la criopreservación de sus espermatóforos y espermatangios.

[Continúa en la página siguiente]

WO 2012/123606 A1

HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

La criopreservación se obtiene mediante el empleo de protocolos óptimos de incorporación y eliminación de crioprotectores permeables (alcoholes, sulfóxidos y formamidas en solución acuosa), y rampas de congelación y descongelación adecuadas. El método aquí descrito presenta una elevada utilidad en la cría en cautividad de especies de cefalópodos con interés comercial, en la conservación de especies en peligro de extinción y en investigaciones que desarrollan técnicas de fertilización *in vitro* en cefalópodos.

MÉTODO PARA LA CONSERVACIÓN INDEFINIDA DE ESPERMA DE CEFALÓPODOS

La presente invención se engloba en el sector técnico de la preservación de células vivas de invertebrados. También pertenece al sector de la preservación de partes vivas de animales. En cuanto a la aplicación de la invención, pertenece al sector de la cría de invertebrados.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La presente invención presenta un método para la conservación de espermatozoides de cefalópodo, en suspensión o mantenidos en el interior de espermatóforos y/o espermatangios, los cuales pueden conservarse enteros o seccionados en porciones.

Los cefalópodos constituyen un grupo de invertebrados marinos de gran interés para la industria alimentaria y así como con aplicaciones en industria farmacéutica y cosmética; e.g., patentes KR20080086751, KR100659040, US2005129739), o para investigación en biomedicina (Lee *et al*. 1994). Los cefalópodos se obtienen principalmente mediante actividades pesqueras, capturándose 4.313.510 toneladas en el año 2007, con un valor de 7.351 millones de US$ (FAO 2009), principalmente calamares de los géneros *Dosidicus*, *Illex* y *Todadores*. No obstante, al contrario que otras especies acuáticas, la producción mediante acuicultura es aún muy reducida, produciéndose sólo 30 toneladas. Aún así informes de expertos indican que los esfuerzos para establecer cultivos intensivos y semi-intensivos de estos animales deberían intensificarse, debido a las características propias de este grupo de rápido crecimiento y riqueza en proteína, su importancia económica actual, el estado de las pesquerías y la proyección futura de su creciente consumo (Sykes *et al*., 2006; Pierce *et al*. 2010).

La incipiente acuicultura de cefalópodos se ha desarrollado principalmente con los géneros *Sepia* y *Octopus* (Vaz-Pires *et al*. 2004; Sykes *et al*., 2006). En la última década se han realizado engordes de ejemplares subadultos de pulpo (*Octopus vulgaris*) con fines comerciales en el noroeste de la Península Ibérica (Chapela *et*

al. 2006; Rodríguez *et al*., 2006). Existen varias patentes orientadas a la cría de cefalópodos, especialmente relacionadas con estructuras y métodos para el mantenimiento y engorde de individuos subadultos y adultos (e.g., CN201163931, ES2121700, JP2002360105, CN201160421, JP9023782, CN201204867, CN101268767, CN101491226, CN101637141). El principal problema actualmente consiste en la cría de paralarvas y juveniles, habiéndose realizado progresos significativos en los últimos años (Iglesias *et al.*, 2007; Villanueva & Norman 2008; Jones *et al.*, 2010; Uriarte *et al*., 2010), reflejados en algunas patentes para la cría de paralarvas (CN101317551, CN101455188) y fertilización *in vitro* en cefalópodos (CN101703013, CN101427658). La patente CN101703034 propone un sistema para la cría de pulpo que incluye entornos para el apareamiento de los adultos, la puesta de huevos y la separación y cría de las paralarvas.

El esfuerzo realizado en investigación y su transferencia en tecnología permite augurar un rápido crecimiento de la acuicultura de cefalópodos, y un incremento de su importancia relativa en la producción destinada a su consumo o utilización industrial. Al mismo tiempo que se mejoran las técnicas de cultivo de cefalópodos y se incrementa el rendimiento de las instalaciones, se pretende mantener el ciclo vital completo de las especies en cautividad. La presente invención se encuadra en este contexto. La aplicación de tecnologías reproductivas ha permitido mejorar la gestión, reducir costes y facilitar programas de selección genética en otras especies (Gosden *et al.,* 2002). Dentro de estas tecnologías, la congelación de esperma, extendiendo su vida útil indefinidamente, tiene una importancia crucial, ya que ha permitido la extensión de programas de inseminación artificial, e incluso el comercio de dosis seminales. La aplicación de esta tecnología en cefalópodos sería muy beneficiosa para mejorar el rendimiento de cultivos de especies oceánicas mediante fertilización *in vitro* (Sakurai *et al*. 1995), para la selección de stocks de progenitores (Iglesias *et al*. 2007), así como para la conservación de especies en peligro de extinción (Freeman *et al.,* 2010).

En la actualidad no existe publicado ningún estudio científico ni ninguna patente en relación con la congelación de espermatozoides ni espermatóforos o espermatangios en cefalópodos. Existen varios estudios relacionados con la estructura y características morfológicas de los espermatozoides de varias

especies (Diaspro *et al.*, 1997; Giménez-Bonafé *et al.,* 2002; Giménez-Bonafé *et al.,* 2004; Cuccu *et al.*, 2007; Li *et al.,* 2010), así como con la fisiología de los espermatóforos de cefalópodos (Austin *et al.*, 1964; Mann *et al.*, 1981; Naud *et al.,* 2006; Wada *et al.,* 2010).

Los espermatóforos constituyen estructuras características de cada especie y por ello tienen importancia taxonómica. Todas las especies de cefalópodos presentan estas estructuras, variando entre ellos el tamaño y la forma de los mismos. Generalmente son de forma tubular y encapsulan en su interior una masa espermática (Austin *et al.,* 1964). Los espermatóforos de los cefalópodos son más elaborados que los de otros moluscos, y poseen la peculiaridad de poseer un mecanismo que, bajo ciertos estímulos mecánicos y durante la cópula, ejecuta la llamada reacción espermatofórica, durante la cual, el espermatóforo se evierte y forma un espermatangio que permanecerá anclado en diferentes superficies del cuerpo de la hembra. Los espermatozoides se forman en el testículo, vasos deferentes y espermiducto. Los espermatóforos, ya con esperma en su interior se almacenan finalmente en la bolsa de Needham del macho. Son transferidos a la hembra durante la cópula, generalmente mediante un brazo modificado denominado hectocótilo y/o un órgano similar a un pene denominado órgano terminal. Dependiendo de las especies los espermatangios pueden ser almacenados en receptáculos seminales de la hembra situados alrededor de la membrana bucal, o implantados directamente en el interior o exterior de la superficie del manto, cartílago nucal, la superficie de brazos y cabeza, o incluidos directamente en los oviductos distales e incluso llegar hasta el ovario. Días, semanas o meses después de la cópula, las hembras fertilizan sus oocitos utilizando los espermatozoides provenientes de estos espermatangios.

La movilidad espermática se inicia por contacto con el agua de mar, pero dentro de los espermatóforos o de los espermatangios unidos a la hembra, los espermatozoides son quiescentes. Esto permite que los espermatozoides permanezcan viables durante largos periodos dentro de estas estructuras. Por lo tanto, los espermatóforos y espermatangios serían las estructuras adecuadas por sí mismas para criopreservar los espermatozoides de este grupo de moluscos, no siendo necesario congelar la masa espermática por sí sola. Una vez

descongelados, la masa espermática sería extraída de estas estructuras y utilizada para fertilizar los oocitos (por ejemplo, utilizando métodos como los descritos en CN101703013 o CN101427658).

La criopreservación seminal es una técnica de gran utilidad para la conservación indefinida de material biológico. Las principales ventajas de la criopreservación se resumen a continuación:
- posibilidad de preservar o conservar el material genético;
- posibilidad de analizar y comparar el material genético, entre varios individuos de una misma especie;
- ayuda o facilitación de cruces, comparado con el cruce de animales formados;
- posibilidad de seleccionar el entrecruzamiento más óptimo en función de por ejemplo las condiciones ambientales;
- posibilidad de comprobar la ausencia de contaminación por agentes infecciosos;
- beneficio de preservar volúmenes reducidos de líquido, comparado con el mantenimiento de animales ya formados.

La técnica de criopreservación de espermatozoides se inició a mediados del siglo XX, y ha sido utilizada exitosamente en numerosas especies de mamíferos y, progresivamente, en otros órdenes de vertebrados. En invertebrados acuáticos, los estudios se han ido incrementando, pero están aún limitados a unas pocas especies de equinodermos (erizos de mar y estrellas de mar), moluscos (ostras, oreja de mar y algunas almejas), poliquetos y crustáceos decápodos de interés comercial. La creación de bancos de esperma en estas especies tiene un enorme potencial para los programas de hibridización, selección de razas o líneas genéticas, ginogénesis, domesticación y conservación de stocks genéticos (Gwo, 2000). Generalmente, el método para congelar espermatozoides de estas especies consiste en pasar la masa espermática o el espermatóforo intacto a un medio con crioprotector, congelar en vapores de nitrógeno líquido o un congelador y mantener las muestras en un congelador o en nitrógeno líquido. La descongelación se realiza en un baño de agua o al aire. Obviamente, la metodología varía considerablemente de unos grupos a otros, dadas las diferencias filogenéticas que existen entre ellos. Por lo tanto, es preciso definir una metodología propia para cada grupo. En el caso de los cefalópodos, los

mecanismos reproductivos y la estructura básica del espermatóforo, con algunas excepciones, es similar en los distintos grupos, lo cual permite diseñar métodos comunes a distintas especies, con pequeños ajustes en varios parámetros (e.g., concentración de crioprotector). La única limitación apreciable para diseñar tal invención reside en el tamaño del espermatóforo, que en algunas especies de gran tamaño, por ejemplo en el pulpo gigante del Pacífico norte *Enteroctopus dofleini* y en el calamar gigante *Architeuthis*, pueden alcanzar un tamaño considerablemente mayor.

La ausencia de un método adecuado para la conservación a largo plazo del esperma de cefalópodo reduce significativamente tanto la posibilidad de cría en cautividad de algunas de estas especies de gran valor económico, como la creación de programas de conservación de especies de cefalópodos actualmente consideradas en peligro de extinción. Esta técnica nunca ha sido empleada en cefalópodos, ni se ha propuesto ninguna metodología con este fin. Esto hace que sea necesaria la búsqueda de un método para criopreservar los espermatozoides de cefalópodos, en suspensión o mantenidos en el interior de espermatóforos y/o espermatangios, mediante el empleo de protocolos óptimos de incorporación y eliminación de crioprotectores permeables, y rampas de congelación y descongelación adecuadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El esperma de las especies de cefalópodos se encuentra constituyendo una masa espermática dentro de unas estructuras denominadas espermatóforos que reaccionan mecánicamente durante la cópula convirtiéndose en espermatangios, estado en el que se encuentran implantados en varias áreas corporales de hembras. El empleo de la técnica de criopreservación de la presente invención con los espermatozoides y/o los espermatóforos/espermatangios de estas especies de cefalópodos permitiría crear programas de conservación de especies en peligro de extinción y facilitaría la cría en cautividad de numerosas especies de cefalópodos oceánicos con elevado interés comercial. La realización de la técnica de criopreservación de la presente invención con los espermatóforos/espermatangios supone además una ventaja añadida frente a la

conservación de la masa espermática libre, puesto que facilita su manipulación y almacenamiento, además de asegurar que los espermatozoides se encuentren quiescentes. El método diseñado y propuesto en la presente invención para la criopreservación de los espermatozoides y/o los espermatóforos/espermatangios de cefalópodo utiliza sustancias crioprotectoras, tiempos y temperaturas de exposición que no resultan tóxicos para los espermatozoides, garantizando, por tanto, una excelente viabilidad espermática previa a la realización del procedimiento. Además, el protocolo de criopreservación de la presente invención ha sido diseñado para poder ser realizado en condiciones de campo sin necesidad de utilizar biocongeladores programables. El método puede ser utilizado de forma precisa pero sencilla, permitiendo incluso su empleo en buques pesqueros y oceanográficos, lo que potencia significativamente su valor y utilidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los espermatóforos (obtenidos de machos maduros) o espermatangios (obtenidos de hembras que han copulado) son enviados al laboratorio en refrigeración (4 °C a 10 °C), en una solución de agua de mar artificial o agua de mar filtrada. El presente procedimiento es útil tanto para aquellas especies que caracterizadas por espermatóforos/espermatangios de pequeño tamaño, que pueden almacenarse sin problemas en criotubos preferentemente de 2 mL a 5 mL o recipientes similares, como para especies con espermatóforos más grandes, desde 1 cm hasta 20 cm. En dichos espermatóforos de mayor longitud, éstos podrían cortarse en secciones preferentemente de 1 cm a 4 cm de longitud e incluirse en criotubos.

Antes de someter los espermatóforos/espermatangios al proceso de congelación, éstos son expuestos a las sustancias crioprotectoras. Se preparan las soluciones crioprotectoras en agua de mar (filtrada preferentemente a 0,2 µm (FSW) o también en agua de mar artificial (ASW)), a una concentración final preferentemente de 5% a 30%. Los estudios realizados muestran que los crioprotectores permeables del grupo de los sulfóxidos, específicamente el DMSO, proporcionan la mayor crioprotección. En cuanto a la toxicidad, hemos comprobado que los sulfóxidos, amidas y alcoholes (metanol y polialcoholes

como el glicerol, propanodiol, etilén glicol) presentan una toxicidad muy baja o inapreciable.

La temperatura y el tiempo de exposición han de ser adecuados y suficientes para garantizar la penetración del crioprotector en la estructura sin que éste resulte tóxico para las células espermáticas. Preferentemente los espermatóforos/espermatangios son expuestos al crioprotector (preferentemente de 0,5 mL a 2 mL) a una temperatura aproximada de 4 °C para reducir la toxicidad y durante un periodo de tiempo preferentemente de 5 min a 30 min, para asegurar la entrada del crioprotector (espermatóforos mayores requieren tiempos más prolongados). La exposición al crioprotector se puede realizar de una vez a la concentración final o en pasos sucesivos a concentraciones crecientes (por ejemplo, preferentemente a 5%, 10% y 20%), permaneciendo preferentemente de 2 min a 10 min en cada solución.

El espermatóforo/espermatangio se transfiere a un criovial preferentemente con 0,5 mL a 2 mL de solución crioprotectora. El criovial se somete a un proceso de enfriamiento de manera que la muestra envasada siga una rampa de congelación predefinida, preferentemente de los 4 °C iniciales a una temperatura preferentemente de -80 °C o menor. Para conseguir la rampa de congelación óptima, los crioviales que contienen la muestra biológica son expuestos a vapores de nitrógeno líquido. Alternativamente, se puede utilizar un dispositivo biocongelador. Para ello se sitúan en un soporte flotante a una altura preferentemente entre 1 cm y 6 cm de la superficie del nitrógeno líquido, consiguiendo una rampa de congelación preferentemente de entre -5 °C/min a -40 °C/min. Los crioviales permanecen en los vapores un tiempo apropiado (preferentemente de 10 min a 30 min), hasta que la temperatura se equilibra con la de los vapores.

La muestra es almacenada en el tanque de nitrógeno líquido durante el tiempo deseado, ya que este procedimiento permite su conservación de forma indefinida. En caso necesario, se podría almacenar la muestra en un congelador de frío profundo (-80 °C), aunque la estabilidad de la muestra no se puede garantizar más allá de unas semanas.

Para la descongelación se utiliza un baño termostatizado a una temperatura preferentemente entre 20 °C y 40 °C, durante 30 s a 2 min, comprobando la descongelación de todo el contenido.

Tras la congelación, la muestra se somete al lavado de los crioprotectores. Este lavado consiste en la transferencia del espermatóforo/espermatangio preferentemente a un volumen de 1 mL a 2 mL de solución de lavado. Se pueden realizar preferentemente de uno a cuatro lavados de este tipo, con un tiempo de 2 min a 5 min en cada lavado. La solución de lavado puede consistir en FSW o ASW, o en crioprotector diluido en FSW o ASW a una concentración menor que la utilizada para congelar (por ejemplo, si se congela con crioprotector al 20%, se puede realizar un primer paso en crioprotector al 5% y un segundo paso en FSW o ASW).
El espermatóforo/espermatangio es finalmente transferido a un tubo preferentemente con FSW o ASW para su utilización.

En una realización preferente de la invención se protege un método para la criopreservación del esperma de cefalópodos que comprende los siguientes pasos:
a) obtención del esperma de los individuos seleccionados, preferentemente el esperma de cefalópodos se encuentra contenido dentro de espermatóforos o espermatangios,
b) preparación de la solución crioprotectora en una solución base a una concentración final entre 5% y 50% y en un caso preferente entre 5% y 30%, preferentemente dicha solución base es agua de mar filtrada o agua de mar artificial, más preferentemente la solución crioprotectora se selecciona entre: dimetilsulfóxido, compuestos del grupo de las amidas y alcoholes, aún más preferentemente la solución crioprotectora se selecciona entre: DMSO, metanol, glicerol, propanodiol y etilenglicol.
c) exposición del esperma a un volumen de solución crioprotectora entre 0.1 mL y 10 mL, y en un caso preferente entre 0,5 mL y 2 mL, a una temperatura entre 0 °C y 25 °C, preferentemente de 10 °C, y más preferentemente de 4 °C, durante 0 a 2 h, en un caso preferente durante 5 min a 30 min, en un criovial,
d) enfriamiento por rampa de congelación del criovial a una velocidad entre -1 °C/min y -100 °C/min, en un caso preferente entre -5 °C/min y -40º C/min, desde una temperatura de +25 °C a por lo menos -20 °C, en un caso más referente desde una temperatura de +4 °C a -80 °C.
En un caso preferente el método para la criopreservación de esperma de

cefalópodos está caracterizado porque los espermatóforos o espermatangios se encuentran enteros o bien seccionados preferentemente en secciones de entre 1 cm y 4 cm de longitud, antes de introducirse en los criotubos o crioviales.

En una realización preferente, el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque los individuos seleccionados pertenecen a una especie de cefalópodos cuyos espermatóforos y espermatangios presentan un tamaño desde 1 cm hasta 20 cm, pudiendo ser almacenados en criotubos de 2 mL a 5 mL, o recipientes similares, enteros o en secciones preferentemente de 1 cm a 4 cm de longitud.

En una realización más preferente, el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque los individuos seleccionados pertenecen a una especie de cefalópodos cuyos espermatóforos y espermatangios se pueden almacenar sin problemas en criotubos de 2 mL a 5 mL, o recipientes similares, enteros o en secciones preferentemente de 1 cm a 4 cm de longitud.

En una realización más preferente dicha especie de cefalópodos pertenece a cualquier orden, aunque preferentemente pertenece a uno de los siguientes ordenes: *Nautilida, Spirulida, Sepiida, Sepiolida, Teuthida, Octopodida* y *Vampyromorphida*. En una realización más preferente dicha especie pertenece al género *Sepia* o al género *Octopus*, y más preferentemente a la especie Volador *Illex coind*etii o *Illex coindetii* Volador.

En otra realización más preferente en el paso a) se conserva el esperma a una temperatura entre 4 °C y 10 °C en una solución base que es agua de mar filtrada o agua de mar artificial.

En otra realización más preferente el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque los pasos b) y c) se repiten con concentraciones finales crecientes, a intervalos de 1%, hasta 25% del diluyente, preferentemente de 5%, 10% y 20% y tiempos de equilibrado entre 1 min y 120 min, preferentemente entre 2 min y 10 minutos, del esperma diluido.

En otra realización más preferente el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque el paso d) de enfriamiento por rampa de congelación es por exposición a vapores de nitrógeno líquido o en un congelador o dispositivo biocongelador, de -20 °C a -130 °C. Preferentemente la exposición a vapores de nitrógeno líquido se realiza situando un soporte flotante a una altura entre 0,5 cm a 10 cm, preferentemente entre 1 cm y 6 cm, de la superficie de nitrógeno líquido, más preferentemente durante 2 min a 120 min, en un caso preferente durante 10 min a 30 min.

En otra realización más preferente el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque puede comprender los siguientes pasos adicionales:

e) descongelación del esperma criopreservado, a una temperatura entre 4º-80 °C, preferentemente entre 20 °C y 40 °C, y más preferentemente entre 20 °C a 35 °C, por un periodo de tiempo entre 2 s y 60 min, preferentemente entre 30 s y 5 min, y más preferentemente entre 30 s y 2 min, y, adicionalmente,

f) lavado del esperma descongelado con un volumen entre 0.5 mL a 10 mL, preferentemente entre 1mL – 2mL, de una solución de lavado, por un periodo de tiempo de hasta 60 min, en un caso preferente por un periodo de tiempo entre 2 min y 5 min, a una temperatura de 4 °C a 25 °C. En un caso más preferente el lavado se puede repetir al menos entre 1 y 4 veces. En un caso particular, la solución de lavado puede ser agua, agua de mar filtrada o agua de mar artificial.

En otra realización más preferente el método para la criopreservación de esperma de cefalópodos está caracterizado porque la solución de lavado del paso f) es solución crioprotectora diluida en solución base, preferentemente agua de mar filtrada o agua de mar artificial, a una concentración menor que la empleada en el paso b).

En la presente invención se entiende por “Criopreservación” el proceso mediante el cual se congelan y mantienen muestras biológicas a muy bajas temperaturas (generalmente entre -80 °C y -196 °C).

En la presente invención se entiende por “Cefalópodo” un invertebrado marino de la Clase Cephalopoda perteneciente al Filo Mollusca. Incluye los Ordenes: Nautilida, Spirulida, Sepiida, Sepiolida, Teuthida, Octopodida y Vampyromorphida. Comprende 47 Familias, 139 géneros y algo más de 700 especies, acorde con la última clasificación comúnmente aceptada por especialistas en este grupo (Sweeney and Roper 1998).

En la presente invención se entiende por “Solución Base” la mezcla homogénea de dos o más sustancias sobre las que se añaden los agentes crioprotectores.

En la presente invención se entiende por “Solución crioprotectora” el compuesto químico que protege a la muestra biológica durante el proceso de enfriamiento y congelación/descongelación.

En la presente invención se entiende por “Preparación de la solución crioprotectora” el proceso mediante el cual los agentes crioprotectores se diluyen en la solución base, en concentraciones parciales crecientes o a concentración final.

En la presente invención se entiende por “Dilución de la solución crioprotectora” el proceso mediante el cual se reduce la concentración de la solución crioprotectora mediante uno o más pasos de lavado en soluciones sin crioprotector o con concentraciones decrecientes de crioprotector.

En la presente invención se entiende por “Concentración del agente crioprotector”la proporción o relación entre la cantidad de agente crioprotector y el volumen final de la solución, entre 5% y 50%.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de tiempo de exposición a la solución crioprotectora” al rango de tiempos en el que la muestra biológica es expuesta a la solución crioprotectora, de 0 a 2 h.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de temperatura de exposición a la solución crioprotectora” al rango de temperaturas en el que la muestra biológica es expuesta a la solución crioprotectora, de 0 °C a 25 °C.

En la presente invención se entiende por “Velocidad de rampa de enfriamiento” la disminución de la temperatura de la muestra en un tiempo determinado, que puede ser variable o constante, de -1 °C/min a -1000 °C/min.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de tiempo de enfriamiento! la duración del proceso durante el cual se somete al esperma, espermatangio, espermatóforo o al tubo que los contiene a una temperatura inferior, fija o decreciente, para conseguir su enfriamiento y congelación. Este intervalo de tiempo de enfriamiento puede extenderse de 2 min a 120 min.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de temperatura de enfriamiento” el rango de temperaturas a las que se encuentra la muestra de esperma, espermatangio o espermatóforo tras el enfriamiento. Esta temperatura puede abarcar de -20 °C a -120 °C.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de tiempo de descongelación” la: duración del proceso (de 2 s a 60 min) durante el cual se somete al tubo que contiene la muestra a una temperatura por encima del punto de congelación del medio crioprotector, para que, al menos, el medio se descongele completamente.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de temperatura de descongelación“el rango de temperaturas a las que se somete la muestra congelada para su descongelación. Pueden utilizarse temperaturas de 4 °C a 80 °C.

En la presente invención se entiende por “Solución de lavado” la solución sin crioprotector o con una concentración de crioprotector menor que la solución crioprotectora, utilizada para reducir la cantidad de crioprotector de la muestra.

En la presente invención se entiende por “Preparación de la solución de lavado” la preparación de la solución base con concentraciones decrecientes del agente crioprotector o sin crioprotector.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de tiempo de exposición a la solución de lavado” la duración de la exposición de la muestra de esperma a la solución de lavado (uno o varios pasos), abarcando cada paso hasta 60 min.

En la presente invención se entiende por “Intervalo de temperatura de exposición a la solución de lavado” el rango de temperaturas a las que se somete la muestra descongelada a la solución o soluciones de lavado. Pueden utilizarse temperaturas de 4 °C a 25 °C.

En la presente invención se entiende por “Viabilidad espermática” la proporción de espermatozoides viables (con la membrana plasmática intacta según una tinción de vitalidad celular (ioduro de propidio, YO-PRO-1, etc.) respecto a la población total de espermatozoides de una muestra.

En la presente invención se entiende por “Movilidad espermática” la proporción de espermatozoides con movimiento propio (evaluados mediante microscopía) respecto a la población total de espermatozoides de una muestra.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efecto de la combinación de crioprotectores al 15% y tiempos (DMS: dimetilsulfóxido; ETG: etilénglicol; GLY: glicerol; MET: metanol; PPD: propanodiol). La línea base es el control (viabilidad: 55,4±6,2). Los resultados se muestran como intervalos de confianza al 95% del valor medio del efecto (círculos).

Figura 2. Criopreservación de espermatóforos usando DMSO al 15% y criotubos colocados en posición horizontal o vertical sobre los vapores de nitrógeno líquido (media y error estándar del porcentaje de espermatozoides con membranas dañadas).

BIBLIOGRAFÍA

- Austin, C. R., Lutwak-Mann, C., Mann, T. (1964). Spermatophores and spermatozoa of the squid *Loligo pealii*. Proc R Soc Lond B Biol Sci 161:143-52.
- Chapela, A.G., A.F; Dawe, E.G; Rocha, F.J; Guerra, A, 2006. Growth of common octopus (Octopus vulgaris) in cages suspended from rafts. Sci. Mar. 70, 121-129.
- Cuccu, D., Mereu, M., Cannas, R., Follesa, M. C., Cau, A., Jereb, P. (2007). Egg clutch, sperm reservoirs and fecundity of *Neorossia caroli* (Cephalopoda : Sepiolidae) from the southern Sardinian sea (western Mediterranean). J Mar Biol Assoc UK 87:971-976.
- Diaspro, A., Beltrame, F., Fato, M., Palmeri, A., Ramoino, P. (1997). Studies on the structure of sperm heads of *Eledone cirrhosa* by means of CLSM linked to bioimage-oriented devices. Microsc Res Tech 36:159-64.
- Freeman, D., Marshall, B., Ahyong, S., Wing, S., Hitchmough, R., 2010. Conservation status of New Zealand marine invertebrates, 2009. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 44, 129 - 148.
- Gimenez-Bonafé, P., Ribes, E., Zamora, M. J., Kasinsky, H. E., Chiva, M. (2002). Evolution of octopod sperm I: comparison of nuclear morphogenesis in *Eledone* and *Octopus*. Mol Reprod Dev 62:357-62.
- Giménez-Bonafé, P., Soler, F. M., Buesa, C., Sautière, P.-E., Ausió, J., Kouach, M., Kasinsky, H. E., Chiva, M. (2004). Chromatin organization during spermiogenesis in Octopus vulgaris. II: DNA-interacting proteins. Mol Reprod Dev 68:232-9.
- Gosden, R., Nagano, M. (2002). Preservation of fertility in nature and ART. Reproduction 123:3-11.
- Gwo, J.-C. (2000). Cryopreservation of aquatic invertebrate esperma: a review. Aquac Res 31:259-271.
- Iglesias, J., S·nchez, F. J., Bersano, J. G. F., Carrasco, J. F., Dhont, J., Fuentes, L., Linares, F., Muñoz, J. L., Okumura, S., Roo, J., van der Meeren, T., Vidal, E. A. G., Villanueva, R. (2007). Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends. Aquaculture 266:1-15.
- Jones, N. J. E., Richardson, C. A. (2010). Laboratory culture, growth, and the life cycle of the little cuttlefish *Sepiola atlantica* (Cephalopoda: Sepiolidae). Journal of Shellfish Research 29:241-246.

- Lee, P.G., Turk, P.E., Yang, W.T., Hanlon, R.T., 1994. Biological characteristics and biomedical applications of the squid *Sepioteuthis lessoniana* cultured through multiple generations. Biological Bulletin 186, 328-341.

- Li, Z., Zhu, J.-Q., Yang, W.-X. (2010). Acrosome reaction in *Octopus tankahkeei* induced by calcium ionophore A23187 and a possible role of the acrosomal screw. Micron 41:39-46.

- Mann, T., Martin, A. W., Thiersch, J. B. (1981). Changes in the spermatophoric plasma during spermatophore development and during the spermatophoric reaction in the giant octopus of the North Pacific, *Octopus dofleini martini*. Mar Biol 63:121-127.

- Naud, M.-J., Havenhand, J. (2006). Sperm motility and longevity in the giant cuttlefish, *Sepia apama* (Mollusca: Cephalopoda). Marine Biology 148:559-566.

- Pierce, G.J., Allcock, A.L., Bruno, I., Bustamante, P., González A., F., Guerra, A., Jereb, P., Lefkaditou, E., Malham, S.K., Moreno, A., Pereira, J., Piatkowski, U., Rasero, M., Sánchez, P., Santos, M.B., Santurtun, M., Seixas, S., Sobrino, I., Villanueva, R., 2010. Cephalopod biology and fisheries in Europe. In: Anderson, E.D. (Ed.), ICES Cooperative Research Report. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, pp. 175.

- Rodríguez, C., Carrasco, J., Arronte, J. C., Rodríguez, M. (2006). Common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile ongrowing in floating cages. Aquaculture 254:293-300.

- Sakurai, Y., Young, R.E., Hirota, J., Mangold, K., Vecchione, M., Clarke, M.R., Bower, J., 1995. Artificial fertilization and development through hactching in the oceanic squids *Ommastrephes bartramii* and *Sthenoteuthis oualaniensis* (Cephalopoda: Ommastrephidae). Veliger 38, 185-191.

Sweeney, M.J., Roper, C.F.E., 1998. Classification, type localities, and type repositories of recent Cephalopoda. Smithsonian Contributions to Zoology 586, 561-599.

- Sykes, A. V., Domingues, P. M., Correia, M., Andrade, J. P. (2006). Cuttlefish culture - : State of the art and future trends. Vie et Milieu 56:129-137.

- Uriarte, I., Hernández, J., Dörner, J., Paschke, K., Farías, A., Crovetto, E., Rosas, C. (2010). Rearing and growth of the octopus *Robsonella fontaniana* (Cephalopoda: Octopodidae) from planktonic hatchlings to benthic juveniles. Biol Bull 218:200-10.

- Vaz-Pires, P., Seixas, P., Barbosa, A., 2004. Aquaculture potential of the common octopus (Octopus vulgaris Cuvier, 1797): a review. Aquaculture 238, 221-238.
- Villanueva, R., Norman, M.D., 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses, Oceanography and Marine Biology: An Annual Review, 46: 105-202.
- Wada, T., Takegaki, T., Mori, T., Natsukari, Y. (2010). Sperm removal, ejaculation and their behavioural interaction in male cuttlefish in response to female mating history. Anim Behav 79:613-619.; 80:177-82.
- Zhang *et al*. 2005, *Nat Cell Biol*; 7: 909-915.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1.

Toxicidad de los crioprotectores:

Se ha comprobado que existe una gran variabilidad en otras especies de moluscos en cuanto a la toxicidad de los crioprotectores sobre los espermatozoides. En cambio, no parece existir una toxicidad acusada para los espermatozoides de cefalópodo mantenidos en espermatóforos/espermatangios y expuestos a distintos crioprotectores.

Los espermatóforos/espermatangios de Volador *Illex coindetii* (calamar oceánico presente en aguas atlánticas y mediterráneas) se introdujeron en crioviales conteniendo 1 mL de crioprotector al 15% en FSW. Los crioprotectores ensayados en este ejemplo fueron DMSO, metanol, glicerol, propanodiol y etilén glicol. Se realizaron varias réplicas para ensayar la viabilidad de los espermatozoides (espermatozoides positivos a Hoechst 33342, indicador de rotura de membrana; evaluación mediante citometría de flujo) tras 5 min, 15 min y 30 min a 4 °C. Tras el tiempo correspondiente, los espermatóforos se lavaron en dos pasos (1 mL del crioprotector al 5% y 1 mL de FSW, 2 min en cada solución). Dentro de cada combinación de tiempo y temperatura se realizó un triplicado. Se comprobó la presencia de espermatozoides móviles mediante microscopía de contraste de fases.

En los resultados (Fig. 1).se comprobó que no había evidencia clara de toxicidad. No obstante, se observó una tendencia hacia un efecto negativo del glicerol,

especialmente a los 30 min. En todos los casos se observó movilidad espermática.

EJEMPLO 2

Criopreservación de espermatóforos en vapores de nitrógeno líquido:

Los espermatóforos/espermatangios fueron introducidos en crioviales conteniendo 1 mL de DMSO al 15% en FSW. La exposición al crioprotector se realizó a 4 °C durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo, los crioviales fueron colocados en un soporte flotante a 2 cm de la superficie del nitrógeno líquido en dos configuraciones: vertical en una gradilla de plástico y horizontal. El conjunto se encuentra dentro de una caja aislante con tapa. Tras 30 min, los crioviales se sumergieron en el nitrógeno líquido y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

Para la descongelación, los crioviales se introdujeron en un baño termostatizado a 30 °C durante 2 min 20 s. Se añadió inmediatamente 1 mL de FSW a 4 °C al criovial. Tras 1 min, el espermatóforo/espermatangio se capturó con pinzas y se colocó en un pocillo de una placa de 24 pocillos conteniendo una solución del crioprotector diluida 1/4 en FSW respecto a la solución crioprotectora utilizada para la congelación. Transcurrido 1 min, el espermatóforo/espermatangio se colocó en otro pocillo de la placa con FSW. Un minuto después, el espermatóforo/espermatangio se procesó para extraer la masa espermática para su análisis, evaluando la viabilidad espermática como en el caso del experimento de toxicidad.

Tras la congelación, la mayoría de los espermatozoides tenían daños de membrana si los criotubos se habían colocado en posición vertical, pero esta proporción se redujo en los espermatóforos que se habían congelado con los criotubos en posición horizontal (Fig. 2). Posiblemente, cuando los criotubos se colocan en posición horizontal, se evita un gradiente de temperatura que puede perjudicar la congelación.

EJEMPLO 3.

Criopreservación de espermatóforos a -80 °C:

Los espermatóforos/espermatangios fueron introducidos en crioviales conteniendo 1 mL de crioprotector al 15% en FSW. Los crioprotectores utilizados fueron DMSO, etilenglicol y glicerol. La exposición al crioprotector se realizó a 4 °C durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo, los crioviales fueron colocados en una caja isoterma para conseguir un enfriamiento lento. La caja se introdujo en un congelador a -80 °C.

Para la descongelación, los crioviales se introdujeron en un baño termostatizado a 30 °C durante 2 min 20 s. Se añadió inmediatamente 1 mL de FSW a 4 °C al criovial. Tras 1 min, el espermatóforo/espermatangio se capturó con pinzas y se colocó en un pocillo de una placa de 24 pocillos conteniendo una solución del crioprotector diluida 1/4 en FSW respecto a la solución crioprotectora utilizada para la congelación. Transcurrido 1 min, el espermatóforo/espermatangio se colocó en otro pocillo de la placa con FSW. Un minuto después, el espermatóforo/espermatangio se procesó para extraer la masa espermática para su análisis, evaluando la viabilidad espermática como en el caso del experimento de toxicidad.

Tras la descongelación, no se recuperaron espermatozoides viables, excepto en el tratamiento con DMSO (6,3±2,2%).

REIVINDICACIONES

1. Método para la criopreservación del esperma de cefalópodos que comprende los siguientes pasos:

a) obtención del esperma de los individuos seleccionados,

b) preparación de la solución crioprotectora en una solución base a una concentración final entre 5% y 50%,

c) exposición del esperma a un volumen de solución crioprotectora entre 0,1 mL y 10 mL, a una temperatura entre 0 °C a 25 °C, de 0 a 2 h en un criovial,

d) enfriamiento por rampa de congelación del criovial a una velocidad entre -1 °C/min y -100 °C/min, desde una temperatura de +25 °C a por lo menos -20 °C.

2. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 1, caracterizado porque el esperma de cefalópodo está contenido dentro de espermatóforos o espermatangios.

3. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 2, caracterizado porque los espermatóforos o espermatangios se encuentran enteros o en secciones de entre 1 cm y 4 cm.

4. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicha especie de cefalópodos pertenece a los Ordenes: Nautilida, Spirulida, Sepiida, Sepiolida, Teuthida, Octopodida y Vampyromorphida. .

5. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 4, caracterizado porque la especie de cefalópodo es *Illex coindetii* Volador.

6. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque en el paso a) se conserva el

esperma a una temperatura entre 4 °C y 10 °C en una solución base que es agua de mar filtrada o agua de mar artificial.

7. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la solución crioprotectora del paso b) se selecciona entre: dimetilsulfóxido, compuestos del grupo de las amidas y alcoholes.

8. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 7, caracterizado porque la solución crioprotectora del paso b) se selecciona entre: DMSO, metanol, glicerol, propanodiol y etilenglicol.

9. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los pasos b) y c) se repiten con concentraciones finales crecientes a intervalos de 1 a 25% del diluyente y tiempos de equilibrado entre 1 min y 120 min del esperma diluido.

9. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el paso d) de enfriamiento por rampa de congelación está seleccionado del grupo que comprende: por exposición a vapores de nitrógeno líquido, en un congelador de -20 °C a -130 °C y en un dispositivo biocongelador.

10. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 9, caracterizado porque la exposición a vapores de nitrógeno líquido se realiza situando un soporte flotante a una altura entre 0,5 cm y 10 cm de la superficie de nitrógeno líquido, por un periodo de tiempo entre 2 min y 120 min.

11. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende los siguientes pasos adicionales:

e) descongelación del esperma criopreservado, a una temperatura entre 4 °C - 80 °C, por un periodo de tiempo entre 2 s y 60 min, y

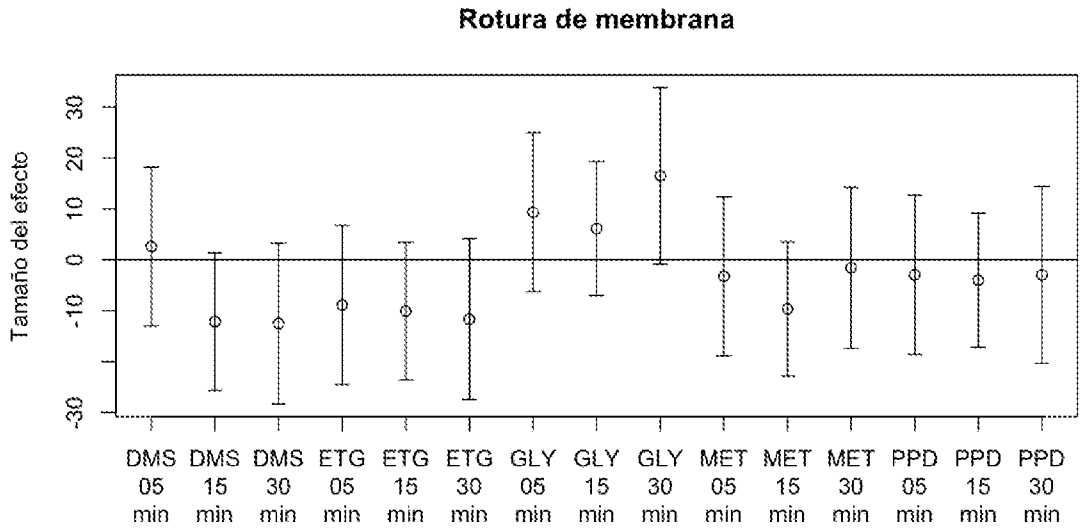
f) lavado del esperma descongelado con un volumen entre 0,5 mL y 10 mL de una solución de lavado, por un periodo de tiempo de hasta 60 min y a una temperatura de 4 °C a 25 °C.

12. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 11, caracterizado porque el paso f) se realiza al menos 1 vez.

13. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 11 o 12, caracterizado porque la solución de lavado del paso f) es agua de mar filtrada o agua de mar artificial.

14. Método para la criopreservación de esperma de cefalópodos según la reivindicación 11 o 12, caracterizado porque la solución de lavado del paso f) es solución crioprotectora diluida en solución base a una concentración menor que la empleada en el paso b).

FIG. 1


Rotura de membrana
Tamaño del efecto
-30
-10
0
10
20
30
DMS 05 min
DMS 15 min
DMS 30 min
ETG 05 min
ETG 15 min
ETG 30 min
GLY 05 min
GLY 15 min
GLY 30 min
MET 05 min
MET 15 min
MET 30 min
PPD 05 min
PPD 15 min
PPD 30 min


Rotura de membrana
%
50
60
70
80
90
100
horizontal
vertical

FIG. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070135

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N, A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, OCEAN, AQUASCI, BIOSIS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAUD, M.J Y HAVENHAND, J.N. Sperm motility and longevity in the giant cuttlefish, *Sepia apama* (Mollusca: Cephalopoda) Marine Biology, 2006, vol. 148, page 559-566.	1-14
Y	GWO, J-C. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. Aquaculture Research, 2000, vol. 31, pages 259-271.	1-14
Y	ZHANG, T. Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species. Chapter 14. In: Life in the Frozen State. 2004. Edited by CRC Press. ISBN: 978-0-415-24700-9, pages 415–435	1-14
Y	SMITH et al. Cryopreservation of shellfish sperm, eggs and embryos. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 2001, vol. 61, pages 31-34.	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
31/05/2012	**(07/06/2012)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer A. Polo Diez Telephone No. 91 3495524

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070135

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/07 (2010.01)
C12N5/02 (2006.01)
A01N1/02 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2012/070135

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N, A01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, OCEAN, AQUASCI, BIOSIS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	NAUD, M.J Y HAVENHAND, J.N. Sperm motility and longevity in the giant cuttlefish, *Sepia apama* (Mollusca: Cephalopoda) Marine Biology, 2006, vol. 148, página 559-566.	1-14
Y	GWO, J-C. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. Aquaculture Research, 2000, vol. 31, páginas 259-271.	1-14
Y	ZHANG, T. Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species. Chapter 14. En: Life in the Frozen State. 2004. Edited by CRC Press. ISBN: 978-0-415-24700-9, páginas 415–435	1-14
Y	SMITH et al. Cryopreservation of shellfish sperm, eggs and embryos. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 2001, vol. 61, páginas 31-34.	1-14

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
31/05/2012	**07 de junio de 2012 (07/06/2012)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado A. Polo Diez Nº de teléfono 91 3495524

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070135

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

C12N5/07 (2010.01)
C12N5/02 (2006.01)
A01N1/02 (2006.01)