



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 511**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

A61D 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07023690 .6**

96 Fecha de presentación : **29.07.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1917974**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2008**

54

Título: **Sistema equino para inseminación artificial no quirúrgica.**

30

Prioridad: **30.07.1998 US 94720 P**
18.12.1998 US 113143 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.04.2011

73

Titular/es: **XY, L.L.C.**
22575 State Highway 6 South
Navasota, Texas 77868, US

72

Inventor/es: **Squires, Edward L.;**
McCue, Patrick M. y
Seidel, George E.

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 511 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

I. CAMPO TÉCNICO

Esta invención se refiere generalmente al campo de la inseminación artificial de equinos. También implica la inseminación artificial equina si ha habido una selección sexual de los espermatozoides para producir un descendiente equino del sexo deseado. Es especialmente relevante en las situaciones en las que se desea una inseminación artificial equina no quirúrgica y también en las que es de importancia práctica la inseminación artificial equina con dosis baja.

II. ANTECEDENTES

La inseminación artificial de yeguas equinas ha sido de importancia durante muchos años. A menudo ésta se ha llevado a cabo de manera quirúrgica. En los ejemplos rutinarios en los que no se requieren dosis de espermatozoides menores, se ha llevado a cabo sin cirugía mediante inseminación artificial, sin embargo, ésta usa una cantidad relativamente elevada de espermatozoides. Para la inseminación artificial rutinaria de la yegua, normalmente se recomienda inseminar con $250-500 \times 10^6$ espermatozoides progresivamente móviles (epm) cada dos días a una yegua en estro, para obtener una fertilidad máxima. Desafortunadamente, al inseminar las yeguas con semen de un semental altamente fértil, la fertilidad disminuye al reducirse la cantidad de espermatozoides móviles. Bajo condiciones ideales, se ha inseminado exitosamente una yegua con tan solo 100×10^6 epm sin reducir la fertilidad, sin embargo, incluso esta cantidad plantea retos. Es necesaria la inseminación con una cantidad baja de espermatozoides si se usa semen sexado clasificado y semen congelado-descongelado en una cantidad limitada.

Por supuesto, es de interés la preselección del sexo de la descendencia en un animal equino. La preselección del sexo tras la inseminación artificial (IA) con una cantidad baja de poblaciones enriquecidas, separadas de espermatozoides que portan el cromosoma X y que portan el Y que se han separado basándose en el contenido de ADN es actualmente posible en otras especies, sin embargo, se ha probado que en cierta manera es más difícil en las especies equinas. Mientras que el nacimiento de la progenie del sexo deseado tras la inseminación intrauterina de reses y ovejas ha ratificado la tecnología de sexado, hasta la presente invención, no se ha aplicado de manera práctica a equinos.

Lograr la preselección de sexo implica separar los espermatozoides que portan el cromosoma X de los que portan el Y seguido del uso de inseminación artificial (IA) o de fertilización *in vitro* (FIV) y posteriormente la transferencia del embrión. La citometría de flujo de alta velocidad actual permite a los investigadores clasificar > 1000 espermatozoides sexados vivos/segundo. Sin embargo, la clasificación sola no es suficiente. Para conseguir que el sexado del semen sea una técnica práctica para un programa de IA equina comercial, se requiere una cantidad inferior de espermatozoides móviles para una dosis de inseminación. Al usar semen reciente para la IA en una yegua, una dosis típica podría contener entre $250 - 500 \times 10^6$ espermatozoides móviles. Con la tasa de clasificación actual de ~ 1000 espermatozoides vivos/segundo, llevaría casi seis días clasificar una dosis de inseminación. Por consiguiente, para lograr de manera práctica una fertilidad razonable se requiere una cantidad inferior de espermatozoides móviles. Una vez se logra esto, también se considera como necesaria de manera práctica la fertilidad potenciada con inseminación no quirúrgica de yeguas con semen sexado.

Tal como se ha mencionado, la preselección del sexo implica el uso de contenido de ADN y la separación de espermatozoides en poblaciones que portan el cromosoma X de las que portan el Y. El uso de citometría de flujo de alta velocidad actual permite a los investigadores clasificar hasta 1000 espermatozoides vivos/segundo del sexo deseado con una precisión del 90%, lo que proporciona una cantidad adecuada de espermatozoides en muchas especies distintas a la equina en una cantidad de tiempo razonable. Por ejemplo, esta tecnología nueva para el sexado de los espermatozoides se ha convertido en una técnica práctica para la inseminación artificial en reses. Ya que es práctico clasificar sólo una cantidad baja de espermatozoides y mantener todavía la viabilidad del esperma, un aspecto de la invención trata la potenciación de las tasas de gestación tras la inseminación de 25×10^6 espermatozoides progresivamente móviles (epm), no clasificados. Esto es aproximadamente un décimo de lo que previamente se consideraba óptimo para operaciones rutinarias. Otros aspectos tratan de cantidades incluso menores. Estos aspectos pueden tener consecuencias económicas significativas si se considera su aplicación para animales de trofeo célebres tales como caballos y similares.

Tal como se ha mencionado, uno de los retos fundamentales al que se enfrenta el esfuerzo de clasificar los espermatozoides equinos X y los Y es la gran cantidad de espermatozoides implicados. En la inseminación natural se producen casi un billón de espermatozoides equinos; en la inseminación artificial menos, pero normalmente todavía se usa una gran cantidad significativa de espermatozoides equinos. Por ejemplo, las técnicas de inseminación artificial equina usan de manera rutinaria de doscientos cincuenta millones a quinientos millones de espermatozoides. Por tanto, se supone que es necesaria una cantidad significativa de espermatozoides en un entorno de inseminación artificial equina.

En tanto que la invención se refiere a la inseminación artificial con selección de sexo, se han intentado muchos procedimientos para lograr la separación de espermatozoides que portan el cromosoma X de los que portan el Y en otros animales. Sin embargo, ninguno de estos han abordado aspectos propios de o la clasificación específica de las células espermáticas equinas. Los procedimientos de clasificación generales varían desde las técnicas magnéticas tales como las que aparecen descritas en la patente de los EE.UU. número 5514537 hasta las técnicas gravimétricas tal como se discute en las patentes de los EE.UU. número 3894529, patente reexpedida número 32350, patentes de los EE.UU.

número 4092229, 4067965 y 4155831. Las propiedades eléctricas también se han intentado determinar tal como se muestra en el documento de los EE.UU. 4083957, así como una combinación de las propiedades eléctricas y gravimétricas tal como se discute en las patentes de los EE.UU. número 4225405, 4698142 y 4749458. Los esfuerzos en la movilidad también se han intentado determinar tal como se muestra en las patentes de los EE.UU. número 4009260 y 4339434. Las técnicas químicas tales como las mostradas en las patentes de los EE.UU. número 4511661 y 4999283 (que implican anticuerpos monoclonales) y las patentes de los EE.UU. número 5021244, 5346990, 5439362 y 5660997 (que implican proteínas de membrana) y las patentes de los EE.UU. número 3687803, 4191749, 4448767 y 4680258 (que implican anticuerpos) así como la adición de componentes de suero tal como se muestra en la patente de los EE.UU. número 4085205. Aunque cada una de estas técnicas se ha presentado como altamente eficaz, de hecho en la actualidad ninguna de estas técnicas proporciona el nivel de preselección de sexo deseado y ninguna ha mostrado éxito en el nivel de inseminación artificial con espermatozoides equinos. Sin embargo, independientemente de la técnica de separación usada finalmente, las combinaciones competidoras de la elevada cantidad de espermatozoides equinos presentes de manera natural y la aproximación de separar los espermatozoides que portan el cromosoma X de los que portan el Y hacen que sea deseable desarrollar una capacidad de lograr la inseminación equina con una cantidad menor de espermatozoides.

La técnica cuantitativa usada para lograr la separación de los espermatozoides que portan el cromosoma X de los que portan el Y para la inseminación artificial (de cualquier especie) es la que implica la técnica de citometría de flujo. Esta técnica parecía posible como resultado de avances y descubrimientos que implican la absorción diferencial de colorante de espermatozoides que portan el cromosoma X y de los que portan el Y. Esto se debatió anteriormente en la patente de los EE.UU. número 4362246 y se expandió de manera significativa por medio de las técnicas descritas por Lawrence Johnson en la patente de los EE.UU. número 5135759. La técnica de Johnson de utilizar citometría de flujo para separar los espermatozoides que portan el cromosoma X de los que portan el Y ha sido un avance tan significativo que ha conseguido por primera vez la separación comercial factible de esos espermatozoides. Además, se ha potenciado significativamente la separación a través de la utilización de citómetros de flujo de alta velocidad tales como el citómetro de flujo de MoFlo® producido por Cytomation, Inc. y debatido en muchas otras patentes incluyendo las patentes de los EE.UU. número 5150313, 5602039, 5602349 y 5643796 así como la publicación de patente internacional PCT número WO 96/12171. Aunque la utilización de citómetros MoFlo® de Cytomation ha permitido grandes incrementos en la velocidad, y aunque estos incrementos son particularmente relevantes dada la elevada cantidad de espermatozoides equinos usado a menudo, todavía permanecen ciertos problemas. A pesar del avance de casi diez veces en la velocidad posible mediante el citómetro de flujo de MoFlo®, por varias razones se han deseado tiempos de clasificación cada vez más cortos. En primer lugar, se ha descubierto que como problema principal, los espermatozoides equinos son células con tiempo crítico. Pierden su eficacia cuanto más tiempo permanezcan sin uso. En segundo lugar, los tiempos de recogida, clasificación e inseminación han conseguido que la velocidad sea un factor de importancia comercial. Por tanto, la naturaleza crítica del tiempo de las células espermáticas equinas y de los procedimientos ha conseguido que la velocidad sea un elemento esencial para lograr tasas de éxito y de eficacia elevadas en la inseminación artificial.

A pesar de varios éxitos en la clasificación y después en la inseminación de manera artificial de animales de otras especies, se ha probado que el esfuerzo con equinos es particularmente difícil de conseguir. Como es relevante a la presente invención, las aplicaciones equinas pueden ser particularmente desafiantes ya que el procedimiento de concepción equina y/o bien los espermatozoides equinos por sí mismos son más delicados que los de otras especies (especialmente bovinos). Por esta razón, puede ser que incluso los expertos en la técnica no hayan visto técnicas ni sistemas desarrollados para otras especies que sean aplicables a los equinos. En algunos ejemplos, los procedimientos casi idénticos con especies no equinas no proporcionan el mismo tipo de resultados para equinos. Esto puede que haya fomentado la separación en los esfuerzos de investigación y en las técnicas y sustancias desarrolladas.

También existen otros problemas que varían desde lo práctico hasta lo teórico. En la parte práctica, se ha deseado lograr la inseminación artificial equina de manera que se pueda realizar en el campo en lugar de en un entorno de laboratorio. Por lo tanto, para la producción y el éxito comercial en el campo, todavía pueden ser significativas las mejoras que puedan sólo representar un incremento en la eficacia o en la funcionalidad. Relacionado con el aspecto práctico, es el aspecto de la delicadeza y de la sensibilidad del proceso global. A este respecto, se ha deseado simplificar el procedimiento y hacerlo lo más procesalmente robusto posible, de modo que el error o la pericia del operador pueda jugar un papel incluso decreciente. Esta finalidad también se ha combinado con hacer incluso más deseable la inseminación con dosis menores.

Además de la delicadeza del procedimiento, siempre se ha sabido que los espermatozoides son en general células extremadamente delicadas. Mientras que este factor a primera vista parece que se puede considerar de fácil comprensión, de hecho, aún no se ha explorado totalmente la extensión total de las sensibilidades de las células. Además, los espermatozoides equinos parecen particularmente sensibles. Al contrario que los espermatozoides bovinos, son más delicados en muchos sentidos desde la perspectiva de la inseminación artificial exitosa. Surgen sensibilidades diferentes y por tanto, en cierto grado existe una percepción de que los sistemas, las técnicas y las sustancias usadas en otros animales (tales como bovinos) no siempre pueden ser adaptables a equinos. De hecho se ha probado que esto es cierto.

En el contexto de la citometría de flujo, en general, la mayoría de las partículas o células clasificadas a menudo pueden resistir físicamente diversos abusos. Este no es el caso de las células espermáticas equinas. De hecho, tal como describe la presente invención, el procesamiento con técnicas de citómetro de flujo normales pueden no ser aceptables,

de hecho, para la clasificación citométrica de las células espermáticas equinas en ciertas aplicaciones. Las sensibilidades varían desde los problemas de dilución y la necesidad inherente del citómetro de flujo de aislar y distinguir cada célula individualmente así como de la presión y el estrés que la citometría de flujo típica (antes de la presente invención) ha impuesto sobre las células equinas fue la clasificación. Esto también representa un factor único para las células espermáticas equinas ya que parece que, aunque la célula espermática equina parece que pasa a través del citómetro de flujo y se clasifica sin efectos secundarios visualmente discernibles, de hecho, las propias células se pueden haber estresado hasta el punto de que realicen menos de lo óptimo en el procedimiento de inseminación. Por tanto, parece implicada una interacción de factores y han surgido problemas inusuales desde la perspectiva de la clasificación de células espermáticas equinas y el uso último para la inseminación artificial equina.

Otro problema que ha permanecido (a pesar de los grandes avances logrados a través de la patente de Johnson y de la tecnología relacionada) es el hecho de que antes de la presente invención ha sido extremadamente difícil lograr la inseminación de dosificación baja con espermatozoides equinos sexados, a pesar de la tecnología de separación usada. Aunque históricamente, se han producido algunos logros en la inseminación de dosis baja, parece que son más en un entorno de laboratorio o teórico que en entornos en los que es probable que se experimente o aplicables a una aplicación comercial. También se produce con las técnicas quirúrgicas. A este respecto, el deseo no ha sido simplemente lograr la inseminación de dosis baja sino lograr la inseminación no quirúrgica en un entorno de campo. Los esfuerzos por tanto son bastante significativos para lograr la inseminación de dosis baja con tasas de gestación exitosas que sean comparables con la inseminación artificial de dosificación elevada, no sexada, existente. Los avances logrados por los presentes inventores tanto en la inseminación artificial de dosis baja sexada como no sexada representan avances significativos que, por primera vez, pueden tener aplicaciones comerciales factibles para los equinos.

Otro problema al que se han enfrentado los expertos de la industria (de nuevo, a pesar de los grandes avances de la patente de Johnson y de la tecnología relacionada) es el hecho de que el propio problema, concretamente, la inseminación artificial equina con una tasa de éxito elevada es de una naturaleza estadística en la que parece que interaccionan una multitud de factores. Por tanto, las soluciones propuestas pueden implicar en cierto grado una combinación de factores que, cuando se estudia a fondo de manera estadística, se mostrarán como necesarios de manera aislada o bien en combinación con otros factores. Esta determinación se compone además por el hecho de que los propios resultados varían según la especie y puede ser difícil de comprobar debido al hecho de que no es probable que la prueba y el muestreo estadístico en una base de datos suficientemente grande valga el esfuerzo en las fases iniciales. Por estas razones, la invención también puede implicar una combinación de factores que pueden representar, individualmente o en combinación, las soluciones apropiadas para una aplicación dada. Por tanto, se considera que esta divulgación es suficientemente amplia para que se puedan lograr varias combinaciones y permutaciones de las técnicas descritas. Pueden existir sinergias con otros factores. Tales factores pueden variar desde los factores dentro de las etapas de clasificación, o posiblemente, del citómetro de flujo hasta los de la recogida así como las etapas de inseminación. Por tanto, aunque ha existido una necesidad insatisfecha pero largamente anhelada de conseguir la inseminación equina sexada de dosis baja, de velocidad elevada, y aunque varias de las técnicas y elementos de implementación han estado disponibles durante mucho tiempo, antes de la presente invención los expertos en la técnica han pasado por alto aparentemente los avances o posiblemente las combinaciones de avances. Incluso puede que sencillamente no se realizara la combinación apropiada de los elementos conocidos. Posiblemente en cierto grado, puede que los expertos en el campo no apreciaran que el problema implicaba una interacción de factores así como las necesidades peculiares de las células espermáticas equinas implicados en este campo. De manera interesante, tal como muestra el listado de esfuerzos más tarde en esta discusión, se han realizado intentos sustanciales pero aparentemente no se entiende el problema inherente en este área de la inseminación sexada de dosis baja de equinos y posiblemente se ha asumido, debido a que el evento del servicio natural implica posiblemente un billón de espermatozoides, que puede que haya limitaciones físicas al logro de la inseminación artificial con cantidades que son de hasta tres órdenes de magnitud inferiores en número. Por tanto, puede que no sea sorprendente que hasta cierto punto haya una enseñanza real, aparte de la dirección técnica, que han seguido los presentes inventores. Posiblemente incluso puede que los resultados se consideren hasta un grado inesperados, ya que han mostrado que se puede lograr la inseminación artificial equina de dosis baja, sexada (si se hace correctamente) con tasas de éxito comparables a las de la inseminación artificial equina de dosis elevada, no sexada. Incluso puede de sea sorprendente para algunos que las técnicas y los avances de la presente invención se combinan de hecho para lograr los grandes resultados mostrados. Mientras que cada técnica puede que se vea, de manera aislada, por algunos como irrelevante, de hecho, parece que los cambios sutiles o la combinación con otras técnicas proporcionan avances significativos en el resultado final.

Por tanto, a este respecto hasta la presente invención no ha sido posible el logro de inseminación artificial equina práctica no quirúrgica, inseminación artificial sexada de dosis baja de equinos con niveles de realización necesarios o procedimientos simplificados que es probable que sean necesarios para lograr la implementación comercial. Además de la inseminación sexada, de dosis baja a nivel comercial, lograda sin embargo, la presente invención también describe técnicas que permiten el logro de mejorar las realizaciones y por tanto facilita el resultado final deseado, concretamente, la inseminación artificial no quirúrgica, sexada y no sexada, de dosis baja de equinos en una base comercial.

III. DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Por consiguiente, la invención describe el logro de sistemas para la inseminación artificial no quirúrgica de yeguas equinas. Estas técnicas son aplicables para el uso de dosificaciones bajas de espermatozoides equinos y están

diseñadas para que se puedan usar en el campo a un nivel práctico y comercial. Además, los sistemas se pueden usar junto con (y tienen una aplicabilidad especialmente valiosa a) la inseminación artificial con espermatozoides equinos sexados. Los sistemas también proporcionan una mejora en la capacidad de clasificar las células espermáticas equinas para determinar su sexo a través de técnicas de separación de citómetro de flujo. Se representan varias técnicas y sustancias pero tal como entenderán fácilmente los expertos en la técnica, se pueden usar varias combinaciones y permutaciones de modo que se puedan optimizar para la realización basada en las necesidades, técnicas de separación, finalidades y otros parámetros implicados en una aplicación de procesamiento equino específico.

Tal como se refiere a la aplicación equina sexada, los objetivos de la invención eran 1) comparar las tasas de gestación en yeguas inseminadas en una sola ocasión, próxima a la ovulación, con 500, 25, o 5×10^6 espermatozoides progresivamente móviles (epm), 2) lograr tasas de gestación razonables tras la inseminación con 25×10^6 espermatozoides sexados clasificados vivos, y 3) desarrollar técnicas para la clasificación del semen.

En uno de los experimentos iniciales, se le asignaron a sesenta y una yeguas 1 de los 3 tratamientos: Se inseminó el grupo 1 (n=20) dentro del cuerpo del útero con 500×10^6 espermatozoides (controles). Se inseminaron el grupo 2 (n=21) y el grupo 3 (n=20) en la punta del cuerno uterino ipsilateral al folículo preovulatorio con 25 y 5×10^6 espermatozoides. Se administró cloprostenol ($250 \mu\text{g}$ i.m.) a las yeguas para inducir la luteolisis y se monitorizó mediante ultrasonografía cada dos días hasta que se detectó un folículo > 30 mm y después diariamente hasta que se detectó la ovulación. Se administró GnRH (2,2 mg de deslorelina, Ovuplant®, Fort Dodge) cuando el folículo dominante era > 35 mm. Se inseminaron las yeguas 34 (n=29) o 40 horas (n=32) después de GnRH. Se excluyeron los datos de 22 ciclos de yeguas ya que ovularon antes de la inseminación planeada (n=11), no ovularon (n=3), o bien ovularon > 4 días después de la administración de GnRH (n=8). Se recogió el semen y se diluyó inmediatamente con un diluyente de leche desnatada (EZ-Mixin, OF, Animal Reproduction Systems, Chino, CA) a 25×10^6 o bien 5×10^6 espermatozoides móviles/ml. Se inseminaron las yeguas que recibieron 1 ml con una pipeta de inseminación artificial de plástico flexible (IMV, Francia), mientras que se inseminaron las yeguas que recibieron 0,2 ml usando una pistola de implante desechable (Veterinary Concepts, Green Valley, WI) que contenía una paja de 0,5 ml. Se usaron diferentes pipetas de inseminación para optimizar la administración de los dos volúmenes diferentes. Se confirmó la localización de las pipetas dentro del útero mediante ultrasonografía transrectal antes de la deposición del semen.

Se determinó la gestación mediante ultrasonografía a los 16 días después de la ovulación. Las tasas de gestación no eran diferentes entre los sementales ($P > 0,05$), así que se combinaron los resultados de los dos sementales. Hubo una diferencia en las tasas de gestación para las yeguas gestadas con el tratamiento de 500×10^6 ($18/20 = 90\%$) frente al de 25×10^6 ($12/21 = 57\%$) ($P < 0,05$). No hubo diferencia entre las yeguas gestadas con el tratamiento de 25×10^6 frente al de 5×10^6 ($7/20 = 35\%$) ($P > 0,05$). No hubo diferencia en las tasas de gestación entre las yeguas gestadas 34 horas frente a 40 horas después de la administración de GnRH, $19/29$ (65%) y $18/32$ (56%), respectivamente ($P > 0,1$). Tampoco hubo diferencia en las tasas de gestación entre las yeguas gestadas con 5×10^6 espermatozoides en un volumen de 1 ml, $3/10$ (30%) o un volumen de 0,2 ml, $4/10$ (40%) ($P > 0,05$). En resumen, las tasas de gestación disminuyeron ya que la cantidad de espermatozoides móviles inseminados disminuyó en este esfuerzo inicial. Sin embargo, se logró una tasa de gestación a los 16 días del 57% con una única inseminación, próxima a la ovulación, con 25×10^6 epm si se depositan en la punta del cuerno uterino.

En otro experimento, se asignaron diecisiete yeguas de manera aleatoria a 1 de los 2 grupos de tratamiento: Se inseminaron las yeguas del grupo A (n=11) con aproximadamente 25×10^6 espermatozoides clasificados vivos en un volumen de 1 ml. Se clasificaron los espermatozoides en un diluyente de semen de leche desnatada comercial (EZ-Mixin, OF, Animal Reproduction Systems, Chino, CA). Una yegua no ovuló y se excluyó del estudio. Se inseminaron las yeguas del grupo B (n=10) con aproximadamente 25×10^6 espermatozoides clasificados vivos en un volumen de 1 ml. Se clasificaron los espermatozoides en EZ-Mixin + yema de huevo al 4% (EY). Se inseminaron dos yeguas (una de cada grupo) con 20×10^6 espermatozoides debido a la limitación de tiempo con los citómetros de flujo. En ambos grupos, se realizaron inseminaciones 34 h después de la administración de GnRH y se depositaron los espermatozoides en la punta del cuerno uterino, ipsilateral al folículo preovulatorio usando una pipeta de IA de plástico flexible. Se confirmó la localización de las pipetas dentro del útero mediante ultrasonografía transrectal antes de la deposición del semen. Se administró cloprostenol ($250 \mu\text{g}$ i.m.) a las yeguas para inducir la luteolisis y se monitorizó mediante ultrasonografía cada dos días hasta que se detectó un folículo > 30 mm y después diariamente hasta que se detectó la ovulación. Se administró GnRH (2,2 mg de deslorelina, Ovuplant®, Fort Dodge) cuando el folículo dominante era > 35 mm. Se usaron dos sementales en este experimento, de los que uno (semental A) se usó en el experimento 1. Se propagó 1:1 en HBGM-3 el semen recién recogido y se centrifugó durante 10 minutos a $400 \times g$ a 22°C . Se aspiró el sobrenadante y se incubaron los espermatozoides en $25 \mu\text{l}$ de Hoechst 33342 a 400×10^6 espermatozoides/ml en HBGM-3 durante 1 h a 35°C y después se diluyó hasta 100×10^6 espermatozoides/ml para su clasificación. Se clasificaron los espermatozoides para determinar los cromosomas sexuales basándose en una diferencia en el contenido de ADN. Para la clasificación se usaron dos clasificadores de células/citómetros de flujo MoFlo® equipados con un láser de argón que emite con una potencia de 150 mW a 352 y 364 nm, funcionando a 344.737 Pa (50 psi) con HBGM-3 como fluido envolvente. Se reanalizaron las alícuotas de poblaciones clasificadas de X e Y para determinar el ADN y proporcionaron purezas del 90 y del 84% para X e Y, respectivamente. Se recogieron los espermatozoides a aproximadamente 900 espermatozoides/segundo en tubos de 14 ml que contenían 4 ml de EZ-Mixin (grupo A) o bien 4 ml de EZ-Mixin + yema de huevo al 4% (grupo B). Se centrifugaron los espermatozoides recogidos y se suspendieron hasta 25×10^6 espermatozoides/ml y se inseminó inmediatamente. Se determinó la gestación mediante ultrasonografía a 12, 14, 16 y 30 días posteriores a la ovulación, y se

sexaron los fetos 60-70 días posteriores a la ovulación sin conocimiento del sexo de los espermatozoides clasificados inseminados. Las tasas de gestación no fueron diferentes entre los sementales (semental A = 3/10, 30%; semental B = 5/10, 50%) ($P > 0.1$), así que se combinaron los juegos de datos. Aunque no hubo diferencia en las tasas de gestación entre los tratamientos con espermatozoides (EZ-Mixin = 3/10, 30% frente a EY al 4% + EZ-Mixin = 5/10, 50%) ($P > 0.1$) esto en definitiva no puede probar que sea cierto. En el día 60, estaban preñadas 5/20 (25%) yeguas; se sexaron los fetos y se predijo perfectamente la razón de sexo fenotípico, cinco de cada cino.

Este ensayo ha demostrado por primera vez, que se puede lograr la gestación en la yegua y que se pueden obtener potros de sexo predeterminado, tras la inseminación no quirúrgica con semen sexado. Esto se explica en la siguiente discusión.

Además, las divulgaciones originales de esta invención se exponen en las solicitudes de patente de los Estados Unidos, con números de serie 60/094.720 y 60/113.143.

Por tanto, un objetivo de la invención es lograr, por tanto, la inseminación artificial de equinos en un entorno de campo sin necesidad de recurrir a procedimientos quirúrgicos. Además, una finalidad es proporcionar la capacidad de usar dosificaciones inferiores de manera que funcionen bajo circunstancias comerciales realísticas y que proporcionen probabilidades de éxito de gestación que sean comparables con las tasas de éxito de dosificación equina tradicional. Un objetivo también es lograr una mejor clasificación para las células espermáticas equinas. Una finalidad paralela es proporcionar sustancias y técnicas que sean especialmente adecuadas para las células espermáticas equinas cuando se separan en componentes que portan el cromosoma X de los que portan el Y. Por tanto, una finalidad es lograr un resultado de clasificación que sea consistente con los esperados de dosificación elevada no clasificados.

Una finalidad también es presentar un sistema global para inseminación artificial equina que puede lograr sus objetos de manera comercialmente práctica. También es una finalidad importante la clasificación de modo que se permita tanto la clasificación equina con estrés bajo como de velocidad elevada y que esté especialmente adaptada para la clasificación de células espermáticas equinas en un contexto de dosis baja.

Naturalmente, se describen objetivos adicionales de la invención a lo largo de otras áreas de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones.

IV. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un diagrama de un sistema clasificador de acuerdo con una técnica de separación de citómetro de flujo para la presente invención.

La figura 2 es un diagrama de las células atrapadas en la boquilla justo antes del área de caída libre de un citómetro de flujo típico.

V. MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Tal como se verá, los conceptos básicos de la presente invención se pueden combinar y realizar de diversas maneras. La invención implica la inseminación artificial equina sexada, de dosis baja comercialmente práctica y los resultados. Para las técnicas de separación de citometría de flujo, la invención también implica tanto los sistemas de citómetro de flujo mejorados como los sistemas para la creación de muestras de espermatozoides equinos de sexo específico que se pueden usar en la inseminación artificial equina y los équidos producidos mediante tales técnicas. Describe los procedimientos globales a través de los que son posibles tasas de éxito elevadas incluso en entornos equinos comerciales. Además, se describen las técnicas en un diseño general de modo que se puedan aplicar a aplicaciones y sistemas específicos una vez se entiendan los principios generales. Aunque se describen las mejoras del dispositivo debe entenderse que estas mejoras no sólo llevan a a cabo ciertos procedimientos sino que se pueden variar y combinar de varias maneras. De manera importante, como todo lo anterior, debe entenderse que esta memoria descriptiva abarca cada una de estas facetas.

Al considerar el aspecto de selección de sexo de la invención, la finalidad básica es la de separar los espermatozoides que portan el X de los espermatozoides equinos que portan el Y, de modo que después se puedan usar para inseminar artificialmente a la yegua con tasas de éxito elevadas. Preferiblemente esta inseminación no requeriría cirugía. La fase de separación se realiza preferiblemente de manera que aísla los dos tipos de espermatozoides equinos de modo que cada uno se puede envasar de manera separada y tratar. En el presente se realiza preferiblemente el aislamiento a través del uso de la citometría de flujo. En general la citometría de flujo es una técnica que se conoce bien. Por ejemplo, sus aspectos se muestran y se discuten en diversas patentes de Cytomation, Inc. tales como las patentes de los EE.UU. y otras publicaciones enumeradas anteriormente.

En general, debe entenderse que durante la meiosis en los testículos, los cromosomas sexuales segregados en espermátides individuales y los espermatozoides haploides llevan el cromosoma X o bien el Y. Hay una razón de 50:50 de espermatozoides que portan el X con respecto a los que portan el Y en el semen, y la fertilización de un ovocito haploide que porta el X mediante un espermatozoide que porta el X o bien que porta el Y determina el sexo del embrión. Existe una razón de 50:50 debido a que los espermatozoides que portan el X y los que portan el Y se producen en igual número y son

fenotípicamente idénticos. Durante muchos años ha sido de gran interés para el público el deseo de alterar esta razón de 50:50 y predeterminar el sexo de la descendencia en mamíferos. Hay numerosos beneficios de la preselección sexual en los animales equinos. También se usa la preselección sexual para producir hembras cuando las enfermedades unidas al X heredable son un problema. A diferencia de los humanos y de la mayoría de animales de granja, la ventaja de la preselección sexual en el caballo también puede ser puramente una preferencia del criador/propietario y los miembros de diversos registros de cría han mostrado un interés considerable.

Durante años, se han realizado numerosos intentos de separar los espermatozoides que portan el cromosoma X de los que portan el Y basándose en las propiedades físicas y químicas de los espermatozoides. Johnson (referenciado anteriormente) sometió a prueba estos procedimientos y encontró que el único método que se probó que era efectivo era el basado en una diferencia en el contenido de ADN de los espermatozoides. Se ha probado que ningún otro método basado en una diferencia física dentro de los espermatozoides o en las propiedades de superficie es efectivo en la separación de los espermatozoides que portan el X de los que portan el Y. Dentro de los equinos, el contenido en ADN de los espermatozoides que portan el cromosoma X con respecto a los que portan el Y en mamíferos difiere en un 4,1%. Esta diferencia en el contenido de ADN se puede usar para separar los espermatozoides que portan el cromosoma X de los que portan el Y después de teñir los espermatozoides con un colorante de unión a ADN, fluorescente, seguido de la citometría de flujo.

La tecnología de clasificación de células/citometría de flujo moderna fue desarrollada por primera vez por Fulwyler en 1965. Principalmente se ha usado la citometría de flujo en diagnósticos e investigación médica con respecto a las células tumorales y los eritrocitos, pero también se puede usar para evaluar muchos tipos de suspensiones celulares incluyendo células espermáticas. Esencialmente, tal como se aplica en la presente memoria la citometría de flujo implica la clasificación de células espermáticas equinas, que se proporcionan al instrumento de citómetro de flujo a través de algún tipo de fuente celular. En la figura 1 se muestra un instrumento conceptual. El instrumento de citómetro de flujo incluye una entrada de muestra, en la presente memoria una fuente de células espermáticas equinas (1) que actúa para establecer o suministrar espermatozoides equinos o algún tipo de factor para que se analice mediante el citómetro de flujo. Se depositan las células dentro de una boquilla (2) de modo tal que las células se rodean por un fluido envolvente (3). Normalmente, se suministra el fluido envolvente (3) mediante alguna fuente de fluido envolvente (4) de modo que mientras la fuente de células espermáticas equinas (1) suministra sus células, se alimenta a la vez el fluido envolvente (3) a través de la boquilla (2). De esta manera se puede entender fácilmente cómo el fluido envolvente (3) forma un entorno de fluido envolvente para las células espermáticas equinas. Ya que se proporcionan al citómetro de flujo los diversos fluidos a alguna presión, fluyen a través de la boquilla (2) y salen por el orificio de la boquilla (5). Proporcionando algún tipo de oscilador (6) que se puede controlar de manera muy precisa a través de un control de oscilador, se pueden establecer ondas de presión dentro de la boquilla (2) y transmitirse a los fluidos que están en la boquilla (2) al orificio de la boquilla (5). Ya que el oscilador (6) actúa por tanto sobre el fluido envolvente (3), la corriente (7) existente en el orificio de la boquilla (5) forma finalmente y de manera regular gotas (8). Debido a que las células están rodeadas por un entorno de fluido envolvente, las gotas (8) pueden contener dentro células individualmente aisladas u otros factores.

Ya que las gotas (8) contienen generalmente células espermáticas equinas aisladas, el citómetro de flujo puede distinguir y separar las gotitas basándose en si la célula o células apropiada(s) está(n) o no contenida(s) dentro de la gota. Esto se lleva a cabo a través de un sistema de detección celular (9). El sistema de detección celular implica al menos algún tipo de detector (10) (que puede incluir dos detectores a 90 grados con respecto a cada uno de ellos) que responde a las células contenidas dentro de cada gota (8) tal como se discutió detenidamente en el trabajo fundamental de Larry Johnson, concretamente, en la patente de los EE.UU. número 5135759. Mientras que la patente de Johnson explica las células espermáticas, el sistema de detección celular (9) puede provocar una acción dependiendo de la presencia relativa o ausencia relativa de un colorante particular que se puede excitar mediante algún estímulo tal como el excitador de láser (11). Aunque se tiñe cada tipo de célula espermática mediante el colorante, la diferente longitud del cromosoma X y del cromosoma Y provoca diferentes niveles de tinción. Por tanto, detectando el grado de colorante presente en las células espermáticas es posible discriminar entre los espermatozoides que portan el X y los que portan el Y mediante sus diferentes niveles de emisión.

Para lograr la separación última y el aislamiento de las células apropiadas en una técnica de separación de citómetro de flujo, las señales recibidas por el detector (10) se alimentan a algún tipo de sistema de discriminación clasificador (12) que toma muy rápidamente la decisión y que puede cargar de manera diferencial cada gota (8) basándose en si ha decidido que la célula espermática equina deseada está o no dentro de esa gota (8). De esta manera el sistema de discriminación clasificador (12) actúa para permitir que las placas de desviación electrostática (13) desvíen las gotas (8) basándose en si contienen o no la célula apropiada u otro factor. Como resultado, el citómetro de flujo actúa para clasificar las células provocando que caigan en uno o más colectores.

Por tanto, detectando alguna propiedad de las células u otros factores, el citómetro de flujo puede discriminar entre las células espermáticas equinas basándose en una característica particular y colocarlas en el colector apropiado (14). En el sistema usado actualmente para clasificar los espermatozoides equinos, las gotas con espermatozoides que portan el X están cargadas positivamente y por tanto desvían en una dirección, las gotas con espermatozoides que portan el Y están cargadas negativamente y por tanto desvían en el otro sentido, y la corriente restante (esto es, las células no clasificadas) no está cargada y por tanto se recoge en una corriente no desviada en un tubo de succión o similar.

En referencia a la figura 2, el procedimiento se puede entender aún más. Tal como se muestra en esta figura, la boquilla (2) emite una corriente (7) que debido al oscilador (6) (no mostrado en la figura 2) forma gotas (8) (no mostradas en la figura 2). Aunque la fuente de células espermáticas equinas (1) (no mostrada en la figura 2) pueda suministrar células espermáticas equinas (15) que se han teñido de acuerdo con la técnica de Johnson, la estimulación de luz mediante el excitador de láser (11) y el estado determinado diferencialmente como se detecta mediante el detector (10) se puede usar para crear la existencia o la inexistencia de una carga en cada gota (8) ya que se separa de la corriente (7). Todo esto se controla mediante el citómetro de flujo. Este control da como resultado gotas no cargadas, cargadas negativamente, cargadas positivamente (8) basándose en su contenido. Tal como se muestra en la figura 1, se muestran ciertas gotas como gotas desviadas (16). Estas gotas desviadas (16) son las que contienen las células espermáticas (15) de uno u otro sexo. Después, se depositan en el colector apropiado (14) para su uso posterior.

Tal como se muestra en la figura 2, se pueden inyectar las células espermáticas equinas (15) en el fluido envolvente (3) mediante una aguja o un tubo de inyección (18). Tal como entienden los expertos en las técnicas de citometría de flujo, se puede conformar el tubo de inyección (18) de forma que se logre la orientación y el enfoque hidrodinámico de modo que estén orientados apropiadamente tanto el lado de la cola como/o el lado más liso de las células espermáticas equinas.

Tal como se muestra, incluso pueden producir una corriente de núcleo de muestra en forma de cinta. Esto puede ser importante ya que la intensidad de fluorescencia de noventa grados se puede ver como proporcional a la orientación de la cabeza del espermatozoide y la intensidad de fluorescencia de cero grados se puede ver como proporcional al contenido de ADN del espermatozoide.

El análisis de ADN citométrico de flujo de alta resolución de los espermatozoides equinos es difícil comparado con el de otras células ya que la cromatina altamente compactada en la cabeza del espermatozoide con forma de pala, plana, provoca un índice elevado de refracción. La diferencia en el índice refractivo entre la cabeza del espermatozoide y el medio que lo rodea, en combinación con la conformación plana de la cabeza del espermatozoide, da como resultado más emisión de fluorescencia a través de la superficie plana de la célula (desde el filo de la cabeza del espermatozoide) que en un ángulo de 90° con la superficie plana. La orientación apropiada de la cabeza es crítica para la clasificación de alta resolución. Otros han investigado procedimientos para controlar la orientación de las cabezas de los espermatozoides que fluyen en una corriente y han encontrado que es efectivo un tubo inyectado biselado (18) para someter a las células a fuerzas hidrofóbicas planas mientras las células fluyen a través del extremo de la boquilla. Se puede empujar la corriente de muestra dentro de una corriente con forma de cinta que puede orientar la cabeza plana del espermatozoide de la misma manera. Otros principios físicos, más complejos, también se aplican a menudo para orientar el espermatozoide.

Tal como se ha mencionado, los espermatozoides que experimentan el procedimiento de clasificación se tiñen con el tinte de fluorocromo Hoechst 33342, conocido químicamente como bisbencimida. Se añade el colorante a la muestra a aproximadamente 9 µM en un volumen de 1 ml que contiene 400 x 10⁶ espermatozoides, y se puede incubar a 32-35°C. Hoechst 33342 no es tóxico para los espermatozoides y no altera de manera significativa la movilidad de los espermatozoides. Hoechst 33342 se une a las regiones A-T de la hélice de ADN. Aunque el procedimiento de clasificación es más productivo si no se recogen los espermatozoides muertos, se puede añadir a la muestra teñida una molécula que desactiva la fluorescencia de Hoechst 33342 y marca los espermatozoides muertos. El colorante alimentario es un ejemplo de una molécula no tóxica que se ha usado. En ese momento del procedimiento se introducen bajo presión (p.e. 344.737 Pa (50 psi)) los espermatozoides teñidos de manera fluorescente en una suspensión líquida en el citómetro de flujo. Los espermatozoides entran en el tubo de inserción de muestra y se orientan en un sentido o en otro, posiblemente mientras salen del extremo biselado del tubo al fluido envolvente. La corriente que contiene los espermatozoides se cruza con un haz láser de iones de argón, en longitudes de onda ultravioleta (351 y 364 nm) de hasta 200 mW de potencia. Aproximadamente el 7% de las gotas contienen una célula espermática cuando la muestra es de 100 x 10⁶ espermatozoides/ml. Se excitan los núcleos teñidos de manera fluorescente mediante el haz láser, desprendiendo señales fluorescentes proporcionales a la cantidad de ADN unido al colorante.

Se usó un sistema de clasificación de flujo comercial modificado para analizar y clasificar espermatozoides basándose en diferencias de ADN. Tal como se mencionó, la señal fluorescente a partir del filo del espermatozoide (ángulo de 90° a partir de la emisión láser) es más brillante que la emitida desde el lado plano (0° hacia el detector). Se usa la emisión del filo para caracterizar la orientación de las cabezas de los espermatozoides mientras pasan por el haz láser. Se recoge la luz que se emite mediante el detector de 90° y se reconocen los espermatozoides apropiadamente orientados. Los espermatozoides que no están orientados apropiadamente desprenden menos luz y se seleccionan electrónicamente fuera de los análisis a menudo, debido a la falta de orientación adecuada, la mayoría de los espermatozoides no se separan en poblaciones enriquecidas de X o de Y. Además, muchas células espermáticas que están orientadas apropiadamente no se clasifican debido a las distribuciones del solapamiento de fluorescencia. Se pueden usar un detector óptico y un tubo fotomultiplicador (TFM) para la detección de fluorescencia a 0°, que es proporcional al contenido de ADN de los espermatozoides orientados apropiadamente. El TFM recoge la fluorescencia emitida por los espermatozoides y convierte la señal óptica en una señal electrónica proporcional, que se amplifica mediante el TFM para un procesamiento de señal y una vista gráfica adicionales. La detección electrónica permite la selección de señales desde 0° hacia el detector sólo para los espermatozoides orientados apropiadamente; esto da como resultado la capacidad de diferenciar entre el ADN de los espermatozoides X y de los Y. Fijando las ventanas de

5 clasificación electrónica alrededor de las poblaciones resueltas, se separan los espermatozoides que portan el X de los que portan el Y en dos tubos. Dos detectores ópticos recogen la luz desprendida y se activan los circuitos que añaden un pulso de carga (+ o -) a las gotas que contienen los espermatozoides que portan el X o que portan el Y respectivos. Mientras caen las gotitas de espermatozoides individuales, pasan por un campo electrostático que empuja las gotitas cargadas que contienen los espermatozoides en tubos separados que contienen un diluyente de "fluido de captura" como medio de sujeción temporal hasta que los espermatozoides se procesen adicionalmente.

10 Las muestras de espermatozoides que se han separado en muestras enriquecidas de cromosoma X y de Y se pueden volver a evaluar para determinar su pureza usando el análisis citométrico de flujo para determinar el contenido de ADN de los espermatozoides individuales. En el pasado, el único procedimiento válido para la verificación de la separación era determinar la razón de sexo de la descendencia, que es inoportuno y caro. El reanálisis usando citometría de flujo no sólo reduce el tiempo y el coste, sino que incrementa la precisión.

15 Con los avances se prevé que se puede incrementar el porcentaje de espermatozoides que están orientados apropiadamente mientras las gotitas pasan por el láser, dando como resultado el incremento en las tasas de clasificación desde 100 espermatozoides vivos/s de cada sexo hasta tasas entre 1000 y 1500 espermatozoides vivos/s de cada sexo al - 90%. Sería útil hacer más práctico este incremento en la tasa de clasificación de los espermatozoides para utilizar semen sexado en un programa de inseminación artificial equino.

20 Otros han comunicado el uso de la cantidad de ADN en los espermatozoides como un marcador para la preselección de sexo y el posterior nacimiento en conejos del sexo predicho tras la inseminación quirúrgica. Se separaron los espermatozoides en poblaciones que portan el cromosoma X de los que portan el Y con un clasificador de células/citómetro de flujo. Se inseminaron quirúrgicamente en el útero los espermatozoides clasificados. De las inseminadas con fracciones enriquecidas con espermatozoides que portan el Y, el 81% de los descendientes nacidos eran machos; las fracciones enriquecidas con espermatozoides que portan el X dieron como resultado el 94% de hembras. Por tanto la razón de sexo se alteró significativamente desde 50:50. Esta razón fenotípica (y genotípica) se predijo precisamente basándose en el reanálisis de ADN a partir de las poblaciones clasificadas, que mostraron purezas del 81% para los espermatozoides que portan el Y y del 86% para los espermatozoides que portan el X. Esto se siguió mediante la publicación de experimentos con cerdos y reses. Se ha usado la fertilización *in vitro* para obtener gestaciones en reses usando semen sexado. Por ejemplo, un investigador transfirió embriones gemelos en cada una de 9 novillas. Cuatro novillas quedaron preñadas y nacieron 6 terneros, todos del sexo predicho. Estos resultados muestran que se pueden separar los espermatozoides viables en poblaciones que portan el cromosoma X y que portan el Y y mantener su capacidad para la fertilización y para producir una progenie normal. También se han obtenido gestaciones tras la fertilización *in vitro* (FIV) con espermatozoides que portan el X y que portan el Y en cerdos y en conejos. Recientemente se han producido embriones bovinos mediante FIV con espermatozoides clasificados mediante citometría de flujo de alta velocidad, pero no se realizaron transferencias de embriones.

35 Usando espermatozoides equinos sexados clasificados en un entorno de laboratorio, un investigador realizó dos experimentos para determinar tasas de gestación con inyección de espermatozoides intracitoplásmica (ICSI) en ovocitos equinos o inseminación oviductal. Trece ovocitos inyectados se desarrollaron hasta el estadio de 2 a 3 células, 8 hasta el estadio de 4 a 6 células y 2 ovocitos se desarrollaron hasta el estadio de 7 a 8 células. Se transfirió un embrión al estadio de 7 a 8 células, pero no se produjo gestación. En el experimento de inseminación oviductal, se inseminaron dos yeguas mediante canulación del extremo fimbriado del oviducto con 50 µl que contenían $1,5 \times 10^5$ espermatozoides que portan el X clasificados. Se detectó una gestación y la yegua produjo un potro hembra.

40 Uno de los aspectos de la citometría de flujo que es particularmente importante para su aplicación en la clasificación de espermatozoides equinos es el funcionamiento a alta velocidad de un citómetro de flujo. Se han realizado avances de manera particular mediante los citómetros de flujo disponibles de Cytomation, Inc. bajo la marca comercial MoFlo®. Estos citómetros de flujo han incrementado extraordinariamente las velocidades y han hecho de la citometría de flujo una técnica que es probable que haga viable la aplicación comercial de la clasificación de los espermatozoides equinos (entre otras aplicaciones comerciales). Actúan para lograr una clasificación de alta velocidad, esto es a una velocidad que es notablemente más elevada que los utilizados de otra manera. Específicamente, los citómetros de flujo MoFlo® de Cytomation actúan con frecuencias de oscilador mayores de aproximadamente cinco kilohercios y más específicamente se pueden hacer funcionar en intervalos de 10 a 30 o incluso de 50 kilohercios. Por tanto, las gotitas se forman a frecuencias muy elevadas y las células contenidas dentro del entorno de fluido envolvente se pueden emitir muy rápidamente desde la boquilla (2). Como resultado, cada uno de los componentes tales como el oscilador (6) de la boquilla (2), y similares que componen y son parte de un sistema de citómetro de flujo, se pueden configurar o seleccionar para dar como resultado un clasificador de células de alta velocidad. En la aplicación de un clasificador de células de alta velocidad para la clasificación de células espermáticas, se logran clasificaciones en tasas mayores de aproximadamente 900 clasificaciones por segundo. De manera importante, debe entenderse que la expresión "alta velocidad" es una expresión relativa de forma que, mientras se logran otros avances en citometría de flujo y aplicaciones específicas, el aspecto que se considera "alto" se puede variar o puede permanecer como absoluto. En cualquier definición, el principio general es que se puede producir la clasificación en tasas en las que los parámetros y las características físicas del citómetro de flujo son significativas para las propias células al clasificar células particulares tales como las células espermáticas equinas.

Un aspecto de la clasificación de alta velocidad que parece entrar en juego al clasificar las células espermáticas equinas a través de una técnica de separación de citómetro de flujo es el de las presiones y el estrés a los que están sometidas las células espermáticas equinas dentro del citómetro de flujo. Por ejemplo, al hacerlo funcionar a altas velocidades (y una definición alternativa de "alta velocidad"), se pueden hacer funcionar los citómetros de flujo a una presión de 344.737 Pa (50 libras por pulgada cuadrada) e incluso mayor. Estas presiones se pueden altas debido a que pueden dar como resultado efectos sobre las células espermáticas equinas que se están clasificando. La clave tal como se describe en la presente invención para este aspecto es el hecho de que los umbrales de estrés de las células particulares son el factor determinante. Adicionalmente, al adquirir más conocimiento, se puede mostrar que los umbrales de estrés son una función de efectos combinados tales como las especies particulares o el manejo anterior o posterior particular de las células espermáticas equinas. La clave en este respecto es que el estrés impuesto sobre las células espermáticas equinas puede, de hecho, alterar su viabilidad y su capacidad de lograr los resultados deseados. Esto puede ser excepcionalmente cierto para especies equinas. En el caso de la presión, puede ser que simplemente al someter las células espermáticas a una presión más elevada como resultado del funcionamiento del citómetro de flujo a esa presión puede dar como resultado la disminución en la realización de las células espermáticas equinas. La presente invención a este respecto actúa para minimizar este estrés y por tanto da como resultado eficacias mayores así como dosificaciones inferiores, tal como se discutió anteriormente.

Al considerar el aspecto del estrés de las células equinas, la presente invención actúa con un diseño que minimiza el estrés. Este estrés se puede minimizar en cualquier punto en el ciclo o procedimiento global de recogida, clasificación o incluso inseminación del animal. De manera importante, el estrés impuesto por el manejo de las células dentro del citómetro de flujo parece significativo para especies equinas. En una realización de la invención, el fluido envolvente se selecciona específicamente de modo que pueda servir en un diseño coordinado con el entorno fluido de células preclasificadas y (o bien) el entorno fluido de células postclasificadas. Por tanto, la presente invención actúa para minimizar los cambios a través del tipo de funcionamiento o de la selección de sustancias que puedan actuar como un medio para minimizar los cambios que experimentan las células espermáticas equinas. Para el fluido envolvente, se selecciona una sustancia de acuerdo con una realización de la invención de modo que se pueda coordinar químicamente para que presente cambios mínimos. Por tanto, seleccionando el fluido envolvente apropiado no sólo en el contexto de los parámetros de citometría de flujo, sino también en el contexto de las células espermáticas equinas y de los propios parámetros de la inseminación artificial equina, se pueden potenciar los cambios experimentados por las células y el resultado global de la clasificación. De manera interesante, para las células espermáticas equinas, se ha descubierto que un medio tamponado de hepes, tal como medio de gametos bovinos de hepes (en particular HBGM3 tal como se creó previamente por J. J. Parrish para una aplicación bovina) funciona bien. Se discute este medio en el artículo "Capacitation of Bovine Sperm by Heparin", 38 *Biology of Reproduction* 1171 (1988). Esto no es sólo sorprendente porque no es el mismo tipo de uso que para los espermatozoides bovinos, sino que el tampón real, se desarrolló originalmente para una aplicación bovina. Por tanto, en la aplicación equina se selecciona el fluido envolvente que contiene el tampón de hepes.

Un aspecto separado del procesamiento del citómetro de flujo que también puede ser importante es el hecho de tratar apropiadamente las células tanto química como físicamente después de que se seleccionen. Tal como se muestra en la figura 2, las células dentro de las gotas (8) caen en el colector (14). El fluido del colector (17) también puede servir para minimizar el estrés sobre las células. A este respecto, aunque puede ser importante proporcionar un nutriente a las células tanto antes como después de la clasificación, se puede seleccionar el fluido del colector (17) de modo que también proporcione una recepción. Para las células espermáticas equinas, se pueden recoger las células en un diluyente de leche desnatada tal como de EZ-Mixin, Animal Reproduction Systems, Chino, CA. Aunque se pretenda para un propósito diferente, se puede usar este diluyente como fluido de colector para células espermáticas equinas. Además, este fluido colector puede incluir también el 4% de yema de huevo.

Otro aspecto que puede interactuar en varios de los factores de la presente invención es el de utilizar cantidades de dosis baja de espermatozoides para la inseminación artificial o similares. Se puede encontrar un antecedente adicional en el aspecto de la inseminación artificial, sexada en "Prospects for Sorting Mammalian Sperm" by Rupert P. Amman y George E. Seidel, Jr., Colorado Associated University Press (1982) y en la publicación PCT previamente referenciada. Tal como se mencionó anteriormente, la inseminación natural en equinos implica cantidades de espermatozoides del orden de un billón de espermatozoides. La inseminación artificial rutinaria se lleva a cabo actualmente con doscientos cincuenta millones o más de espermatozoides para especies equinas. La expresión "dosis baja" significa que la dosificación de espermatozoides utilizados en el evento de inseminación es menos de un cuarto o preferiblemente incluso menos de aproximadamente el 10% o el 5% de la cantidad típica de espermatozoides proporcionados en un evento de inseminación artificial equina típica. Por tanto, la expresión "dosis baja" debe verse en el contexto de la dosificación de inseminación artificial típica o también como una cantidad absoluta. Las cantidades absolutas pueden ser dependientes de las especies, por supuesto. Para especies equinas, se puede considerar una procedimiento de dosis baja simplemente menos de aproximadamente veinticinco, diez, cinco o incluso un millón de espermatozoides.

Todavía otro aspecto que puede ser importante es el hecho de que se utilicen los espermatozoides sexados a través de las técnicas de la presente invención (o de otro modo) en un sistema de inseminación artificial equina. Por tanto, para una técnica de citómetro de flujo, si se usa el colector (14) para proporcionar espermatozoides para inseminación artificial, las técnicas de la presente invención pueden ser particularmente relevantes. Además, es posible que la combinación tanto del uso de inseminación artificial equina como del uso en un entorno de dosis baja pueden crear juntos

sinergias lo que hace particularmente apropiadas las diversas técnicas de la presente invención. De manera natural, no sólo se pueden utilizar los espermatozoides sexados en un modo de inseminación artificial, sino en otras técnicas tales como la fertilización *in vitro* y similares.

5 El procedimiento de recogida, clasificación y finalmente inseminación de un animal a través del uso de una clasificación de citometría de flujo u otra técnica de separación, implica una variedad de etapas. En el contexto de inseminación equina, en primer lugar se recoge el semen del semental. Se puede recoger el semen a partir de sementales de fertilidad elevada conocida antes de la inseminación planeada. Esto se puede producir con una vagina artificial de modelo Colorado (Animal Reproduction Systems, Chino, CA) equipada con un filtro de gel en línea. Se pueden evaluar los eyaculados para determinar el volumen libre de gel, la movilidad y la concentración de espermatozoides. Después se puede propagar el semen con un diluyente de glucosa de leche desnatada comercial (EZ-Mixin, OF, Animal Reproduction Systems, Chino, CA) a 25×10^6 epm/ml ($n=51$) o bien a 5×10^6 epm/ml ($n=10$). Se debe mantener el semen a temperatura ambiente hasta que se realicen las inseminaciones, próximamente después de la recogida. Se puede llevar a cabo la tinción de acuerdo con un protocolo de tinción simple o de tinción múltiple, la última es el sujeto de la patente de Johnson y de la tecnología relacionada.

15 Después de añadir el tinte, se puede llevar a cabo la dilución o propagación hasta la concentración de clasificación deseada. Después se puede llevar a cabo la clasificación de acuerdo con las diversas técnicas discutidas previamente a partir de las que se pueden recuperar las células espermáticas en la fase de recogida.

20 Posiblemente se ha establecido bien una cantidad óptima de espermatozoides móviles por dosis de inseminación para maximizar la fertilidad con técnicas anteriores en especies tales como el cerdo, la oveja y las reses. Con la presente invención, la cantidad mínima de los espermatozoides móviles parece que es mucho menos de los 250 a 500×10^6 espermatozoides progresivamente móviles (epm) recomendados normalmente. Bajo condiciones ideales, incluso se han inseminado las yeguas con tan solo 100×10^6 epm sin reducir la fertilidad. (Los investigadores no encontraron diferencia entre las yeguas inseminadas durante tres ciclos con 100 ó 500×10^6 epm y lograron tasas de peñez del 63,9 y del 75%, respectivamente.) La presente invención muestra incluso cantidades menores que ahora son posibles (y que se pueden lograr las cantidades menores en un entorno de campo).

25 Aunque la diferencia no era significativa, en un experimento las tasas de gestación para los tratamientos con 100 y 500×10^6 para ciclos 1, 2 y 3 eran del 25 frente al 39, del 33 frente al 45 y del 28 frente al 25% respectivamente. Notablemente, otros han comunicado un incremento en la tasa de potros cuando la cantidad de espermatozoides móviles por inseminación se incrementó desde 40 hasta 80×10^6 , pero no se observó una mejora adicional cuando se incrementó la cantidad de espermatozoides hasta 160×10^6 . En un experimento usando dos grupos de 14 yeguas subfértiles, un investigador no encontró diferencia entre los tratamientos utilizando 100 ó 500×10^6 espermatozoides móviles por inseminación (del 35,7 frente al 42,9%, respectivamente). Posteriormente, el mismo investigador comunicó tasas de gestación después del apareamiento sobre tres ciclos de yeguas inseminadas con 50 , 100 y 500×10^6 epm del 41,7, 65,6 y del 81,3%, respectivamente, de datos promediados a partir de varios experimentos. Aún más en la técnica, se inseminaron yeguas (durante tres ciclos) con 50 y 500×10^6 epm y se logró una diferencia significativa entre las tasas de peñez del 37,5 y del 75%, respectivamente. En un estudio más reciente, uno de los inventores superovuló yeguas con extracto de hipófisis equina (EPE) e inseminó yeguas una vez con 50×10^6 epm. Las tasas de gestación no eran diferentes entre las yeguas tratadas con EPE y los controles salinos (del 65 y del 55%, respectivamente).

30 En la inseminación artificial equina rutinaria existente, parece que hay una pequeña diferencia en la fertilidad entre 100 y 500×10^6 espermatozoides por dosis de inseminación, generalmente se recomienda 500×10^6 epm para proporcionar la fertilidad máxima. Sin embargo, cuando se utilizaron técnicas de inseminación artificial apropiadas, también se pensó que 100×10^6 epm de un semental altamente fértil era el mínimo adecuado con las técnicas anteriores. En la circunstancia más aceptada, cuando se realiza la inseminación artificial rutinaria (IA) con yeguas y sementales fértiles, se ha comunicado que 500×10^6 espermatozoides progresivamente móviles /dosis inseminados cada dos días mientras las yeguas están en estro dan como resultado la fertilidad máxima. Tal como se aludió anteriormente, el problema con esto es simple, puede ser necesaria la inseminación de yeguas con una cantidad baja de espermatozoides si el semen es limitado o si se usa semen sexado clasificado.

35 Tal como se mencionó anteriormente, actualmente es posible obtener aproximadamente 1000 espermatozoides vivos equinos/segundo ($3,6 \times 10^6/h$) de cada composición cromosómica sexual cuando se clasifican los espermatozoides para determinar los cromosomas sexuales mediante citometría de flujo con una precisión del 90%. Por tanto, no sería práctico obtener 500×10^6 espermatozoides que se clasifiquen para determinar sus cromosomas sexuales para una inseminación de $3,6 \times 10^6$ espermatozoides/hora. La finalidad, por consiguiente, era lograr cantidades inferiores de espermatozoides por dosis de inseminación mientras se obtiene una fertilidad razonable. El objetivo era lograr tasas de gestación en yeguas inseminadas en un única ocasión, próxima a la ovulación, con tan solo 25 o 5×10^6 o menos espermatozoides progresivamente móviles (epm).

40 El eyaculado de semental normal contiene un volumen promedio de 50 ml. El semental deposita este volumen elevado de semen directamente en el útero de la hembra. En otras especies (verraco) que eyaculan varios cientos de ml de semen, sólo 0,5-0,1 ml entra en cada trompa de falopio en el comienzo del estro para permitir la fertilización. Este gran volumen seminal llena la región de la unión útero-tubárica hasta que una reserva de espermatozoides se establece en el

istmo. Por lo tanto, se establece en el istmo un volumen específico de semen y el contenido restante se elimina rápidamente.

5 Para la inseminación artificial, la cantidad de espermatozoides en una dosis de espermatozoides puede ser crítica. A menudo se usan diluyentes seminales para diluir semen natural para proporcionar volúmenes de inseminación más grandes y más fácilmente manejados. En la técnica anterior, se recomienda generalmente que el volumen varíe entre 10 y 25 ml de semen aunque, ahora, posiblemente dependiendo de la concentración de espermatozoides, se puede probar que los volúmenes de inseminación pequeños son tan efectivos como los volúmenes más grandes. Aunque no se especificó la concentración, los volúmenes de inseminación que varían desde 0,6-26,8 ml de semen no afectaban de manera adversa a la fertilidad cuando se estudiaron los efectos de la inseminación de 10 ó 50 ml de volúmenes de semen propagado sobre las tasas de recuperación de embriones en yeguas. Pero basándose en este experimento, se produjo una reducción en las tasas de recuperación de embriones de yeguas inseminadas con un volumen de 50 ml de semen propagado comparado con un volumen de 10 ml cuando ambas contenían una cantidad igual de epm. La fertilidad reducida puede deberse al incremento de volumen inseminado o puede deberse a la disminución de la concentración de espermatozoides ya que era $1/5^{\circ}$ del volumen de 10 ml (5 frente a 25×10^6).

15 Se llevaron a cabo experimentos adicionales para determinar: 1) la tasa de recuperación de embriones cuando se inseminaron las yeguas con 100×10^6 epm propagados en 10, 100 ó 200 ml de diluyente de leche desnatada en polvo y 2) la tasa de recuperación de embriones cuando se inseminaron las yeguas con 250×10^6 epm propagados en 10 o bien 100 ml del mismo diluyente que el experimento 1. Los resultados del experimento 1 mostraron una diferencia en los embriones recuperados sólo entre yeguas inseminadas con 10 (40%) y 200 ml (0%). En uno de estos experimentos, se produjo una diferencia significativa entre las yeguas inseminadas con 10 ml (70,6%) comparado con 100 ml (13%). Por tanto, los volúmenes de inseminación de 100 ó 200 ml se asociaron con las tasas de recuperación de embriones menores de un volumen de 10 ml, debido probablemente a una concentración de esperma menor o a una pérdida retrógrada de espermatozoides en la vagina.

25 Llevaron a cabo un estudio para someter a prueba si el volumen solo afecta a la fertilidad si están presentes concentraciones y cantidades de esperamtozoides suficientes. Concluyeron que no hubo diferencia entre las yeguas inseminadas con 30 o bien 120 ml de semen enfriado a una concentración de 50×10^6 epm/ml. Esta aproximación, sin embargo, no está seguida de la presente invención hasta cierto grado.

30 El tiempo y la frecuencia de inseminación pueden jugar un papel muy importante en la mayoría de las operaciones de apareamiento, especialmente cuando está implicado el semen congelado o enfriado para envío. La cantidad y el tiempo de inseminaciones puede afectar a la fertilidad. Una yegua ovula de promedio cada 21 días durante la época de apareamiento fisiológico y la duración promedio del estro durante este tiempo es de 5 - 7 días. Durante el estro, las yeguas orinarán de manera pasiva, levantarán su cola, y presentarán sus cuartos traseros al semental. Bajo condiciones naturales, cuando un semental se introdujo en una yeguada de 20 yeguas, la cantidad de apareamientos por hora de observación era de $2,4 \pm 0,2$. A menudo los sementales se aparean con la misma yegua múltiples veces por día (bajo condiciones naturales). En un estudio, se sincronizaron 20 yeguas y se situaron en un pasto con un semental y se observaron durante 9 días. El semental copuló 9,12 veces por día y cubrió a 17 de las 18 yeguas.

35 Los investigadores también han recopilado datos sobre épocas de apareamiento múltiple comparando el efecto de la cantidad de inseminaciones sobre las tasas de gestación. Se quedaron preñadas más yeguas cuando se inseminaron cinco veces (68%) más que las yeguas que se inseminaron tres veces (35,9%) durante el ciclo 1. No se anotaron otras diferencias con respecto a la cantidad de inseminaciones en las tasas de peñez durante el ciclo 1. No hubo diferencia en las tasas de gestación durante los ciclos 2 y 3 cuando se inseminaron las yeguas de una a siete veces. Se quedaron preñadas más yeguas cuando se inseminaron 5 veces (60%) que las yeguas inseminadas 1 (23,5%), 2 (35%), o 3 veces (35,5%) durante 3 ciclos. Cuando se consideran los 3 ciclos, las yeguas que quedaron preñadas se inseminaron un promedio de 3,3 veces, que era más del promedio de 2,8 veces para las yeguas que no se quedaron preñadas.

45 También se ha determinado que las inseminaciones múltiples por ciclo no fueron perjudiciales para la fertilidad. En un estudio, se recogieron datos a partir de 257 yeguas durante un periodo de 10 años para establecer el relación entre la cantidad de inseminaciones por ciclo, la duración del estro y las tasas de gestación. Las yeguas se inseminaron con 100×10^6 espermatozoides. Se lograron tasas de gestación en el primer ciclo del 22,0, 23,0, 38,6, 52,5, 58,3 y 52,2% cuando las yeguas se inseminaron 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 ó más veces por ciclo, respectivamente. Se quedaron preñadas menos yeguas después de tres ciclos cuando se inseminaron 1 - 4 veces por ciclo que las yeguas inseminadas > 12 veces por ciclo. En otro estudio se inseminaron 62 yeguas durante tres ciclos cada 48 horas durante el estro con 200×10^6 epm durante un máximo de tres inseminaciones. Las inseminaciones comenzaron cuando se detectó un folículo > 30mm y se continuaron hasta la ovulación. La fertilidad por ciclo era del 45% y no era diferente si se realizaban dos o más inseminaciones por ciclo en comparación con una inseminación por ciclo. También determinaron que se lograron las tasas de gestación más altas con inseminaciones llevadas a cabo entre 48 y 72 (8/23) ó 72 y 96 horas (8/23) antes de la ovulación y que la última inseminación no era la que fertilizaba, al menos el 51% del tiempo. En conjunto, cuando se realiza la IA rutinaria con yeguas y sementales fértiles, 500×10^6 epm/dosis inseminados cada dos días mientras las yeguas están en estro dan como resultado la fertilidad máxima. Con la presente invención, ahora son posibles cantidades mucho menores.

La inducción de la ovulación en un momento específico en la yegua puede ser ventajosa por las razones siguientes: para asegurar que se producirá la ovulación dentro de 36-48 horas de copulación eliminando la necesidad de reapareamiento, (b) con el uso de semen sexado, congelado o enfriado cuando el tiempo es crítico para maximizar la fertilidad, (c) para asegurar que sólo se necesite una única inseminación próxima a la ovulación cuando se utiliza yeguas o sementales subfértiles, (d) para minimizar el transporte del semental o la yegua y (e) para escalonar las ovulaciones cuando están presentes múltiples yeguas en estro al mismo tiempo.

La gonadotropina coriónica humana (GCH) se produce mediante el citotrofoblasto de las vellosidades coriónicas de la placenta humana. Es una hormona de glucoproteína compuesta de dos subunidades (α y β) que están unidas juntas de manera no covalente. Tiene un tiempo de vida media de 8-12 horas en la sangre. El uso de la GCH para la inducción de la ovulación durante el ciclo del estro en la yegua se comunicó por primera vez en 1937 por Mirskaja y Petropavlovski. Encontraron que se producía la ovulación dentro de 24 a 48 horas después de la inyección de extracto bruto de orina de gestación humana (Prolan®) inyectado en el primer día del estro. Estudios adicionales han mostrado que cuando se inyecta el GCH (1500-3300 IU) en una yegua durante el estro temprano, imita la actividad de la hormona luteinizante (HL) e induce la ovulación, generalmente dentro de 24-48 horas. El uso de GCH en una dosis de 2000- 3000 IU no ha disminuido la fertilidad. Sin embargo, algunos investigadores encontraron que dosis mayores (4500-6000 IU) dieron como resultado trastornos reproductivos y una disminución en la tasa de gestación. Aunque el uso de GCH puede ser muy efectivo al inducir la ovulación, varios investigadores han mostrado que la administración de GCH durante varios ciclos de estro consecutivos puede dar como resultado la formación de anticuerpos, con una duración media del estro y de la ovulación o bien la misma que las yeguas de control o bien 2 días más que los controles.

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) nativa es un decapeptido sintetizado en el hipotálamo y almacenado en los gránulos secretores de la eminencia media. Tras la liberación, la GnRH entra en el sistema portal y se transporta a la adenohipófisis y se une a los receptores en las células gonadotropas en las que estimula la síntesis y la secreción de la hormona luteinizante (HL) y de la hormona estimulante del folículo (FSH). También se ha llevado a cabo la investigación sobre el uso de GnRH nativa y de análogos de GnRH en los que se han modificado 1 ó 2 aminoácidos al inducir la ovulación durante el estro en la yegua.

La administración continua o pulsátil de la GnRH nativa provoca la ovulación predecible. En un estudio 11 yeguas en ciclo se infundieron con solución salina o bien con 20 μ g de GnRH en un patrón en pulsos (un pulso cada 5 segundos/h, 2 h o 4 h) comenzando el día 16 del ciclo del estro. La cantidad de días desde el comienzo del tratamiento de ovulación era inferior en yeguas infundidas con 20 μ g de GnRH/h comparado con yeguas con control salino o 20 μ g de GnRH por 4 h. Se concluyó que la infusión pulsátil de GnRH es efectiva para adelantar la ovulación, pero la frecuencia del pulso es una variable crítica. También se ha usado la GnRH nativa para inducir el desarrollo folicular y la ovulación en yeguas en la temporada de anestro. Un implante a corto plazo que libera 1,5 ó 2,2 mg del análogo de GnRH deslorelina provoca la ovulación dentro de 36-48 horas cuando se administra a yeguas en estro con un folículo > 30 mm de diámetro.

Uno de los inventores ha comparado el efecto de varias dosis de un implante de un análogo de GnRH (acetato de deslorelina), en la inducción de la ovulación en yeguas en ciclo y encontró que se indujo la ovulación en la mayoría de las yeguas dentro de 48 h después de la inyección y que no se produce una ventaja con dosis mayores de 2,2 mg/yegua. Otros han comparado el uso de GCH, buserelina (un análogo de GnRH) y luprostiol (un análogo de PGF₂ α) en la inducción de la ovulación en yeguas en ciclo. Tanto la buslerelina como la GCH acortaron el intervalo desde el tratamiento hasta la ovulación, mientras que el luprostiol no aceleró la ovulación.

El extracto de hipófisis equina (EPE) deriva de la adenohipófisis. Se ha descrito la preparación de EPE para la experimentación como gonadotropina en bruto por Braselton y McShan (1970), y más recientemente por Guillou y Combarous (1983), incorporándose cada uno por referencia en la presente memoria. Se ha usado EPE en la yegua primeramente para inducir el crecimiento de folículos múltiples en yeguas en ciclo o en anestro y para la superovulación en la oveja.

Se ha conocido el uso de extracto de hipófisis equina como agente ovulatorio en la yegua. En estudios, algunos han separado la hormona luteinizante equina (HLE) y la hormona estimulante del folículo equina (eFSH) mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y se llevaron a cabo experimentos. En un experimento, se comparó la actividad de la HL en gonadotropina equina bruta (CEG) con la actividad de la HL en la fracción de HIC sobre su capacidad para inducir la ovulación. De 25 yeguas de control, 7 ovularon dentro de 48 h en comparación con 24/25 yeguas tratadas con CEG y 19/26 yeguas tratadas con HL. Se diseñó otro experimento para someter a prueba la capacidad de la fracción enriquecida con eFSH de extracto de hipófisis para inducir el crecimiento de múltiples folículos comparado con CEG. La cantidad de folículos que alcanzaron 30 mm era el mismo en grupos tratados con CEG frente a FSH y ambos grupos eran diferentes cuando se compararon con el grupo de control. Las tasas de ovulación no eran diferentes entre los dos grupos de tratamiento pero eran diferentes a las del grupo de control.

Históricamente, el procedimiento usado más comúnmente para inducir la ovulación es una inyección única de GCH. Éste todavía sigue siendo el procedimiento más común. Sin embargo, ya que no hay diferencia en las tasas de gestación o en el tiempo de ovulación cuando se administra GnRH o bien GCH a yeguas en ciclo, cada tratamiento es un procedimiento aceptable para inducir la ovulación. Sin embargo el EPE, no está disponible comercialmente para médicos y por lo tanto no es una técnica práctica para inducir la ovulación.

Bajo condiciones de apareamiento naturales, el eyaculado del equino se deposita directamente dentro del útero de la yegua. Spallanzani fue el primero en comunicar la inseminación artificial (IA) en perros, y después en caballos a finales de los 70. El uso de IA se ha documentado en reses, ovejas, cerdos y caballos. Los caballos, las reses y los cerdos se inseminan artificialmente dentro del cuerpo uterino; las ovejas, los perros en el cuello uterino; y los gatos en la parte anterior de la vagina. En cuanto a equinos, otros han descrito procedimientos de recolección y de manejo seminal rutinarios para el caballo. Para procedimientos de IA rutinarios, se deposita el semen dentro del cuerpo uterino usando una pipeta y una jeringuilla de inseminación estériles. Sin embargo, hay varias razones para el uso de técnicas y lugares alternativos para la inseminación artificial: a) inseminación de semen congelado-descongelado de calidad baja o de cantidad limitada, b) inseminación de semen a partir de un reproductor subfétil o c) inseminación con semen sexado, que es de cantidad limitada. Algunas técnicas de IA alternativas incluyen: inseminación intrauterina (por medio de laparoscopia o técnicas no quirúrgicas) en especies en las que las inseminaciones vaginales o cervicouterinas se realizan de manera rutinaria, inseminación oviductal (por medio de laparoscopia o laparotomía por el flanco), o inseminación no quirúrgica intrauterina profunda.

La inseminación intrauterina laparoscópica ha evolucionado como la técnica menos invasiva para depositar semen directamente en el útero de ovejas y de cabras desde comienzos de los años 70 cuando se desarrolló el equipo adecuado. La inseminación laparoscópica se realiza de manera rutinaria en la oveja y la cabra con una fertilidad alta comparada con la IA tradicional. La inseminación intrauterina laparoscópica también ha sido comunicada exitosamente en el hurón, el gato doméstico, el tigre, el guepardo y el leopardo, y más recientemente en la zarigüeya y el walabí. Algunas ventajas de la inseminación laparoscópica incluyen: mejora genética utilizando semen congelado, cantidades incrementadas de inseminaciones por recogida usando cantidades de espermatozoides menores y de fertilidad mayores.

La principal desventaja de la inseminación laparoscópica es el alto coste del equipo y del procedimiento (labor del experto, fármacos, procesamiento del semen). Este procedimiento también es relativamente invasivo para el paciente.

La inseminación intrauterina no quirúrgica con ovejas se usa en un intento de incrementar las tasas de fertilidad en especies que se inseminan de manera rutinaria en el cuello uterino. Un investigador obtuvo una tasa de corderos del 75% tras la inseminación intrauterina, comparado con el 17% después de la inseminación cervicouterina profunda y el 30% después de la inseminación caudal del cuello del útero doble. En otro estudio, un investigador depositó espermatozoides de carnero congelados-descongelados en tres regiones del tracto genital de las ovejas. En el grupo 1, se realizó una única inseminación intrauterina, mientras que en el grupo 2, se inseminaron las ovejas una vez de manera profunda en el cuello uterino y en el grupo 3 se inseminaron las ovejas dos veces, 12 horas aparte, en la región caudal del cuello del útero; las tasas de concepción eran del 89, 45 y del 57% respectivamente. Otros comunicaron resultados similares con inseminación intrauterina. También se ha realizado la inseminación endoscópica no quirúrgica en perras dando como resultado tasas de gestación altas.

Con la inseminación oviductal (O1) se insemina quirúrgicamente una pequeña cantidad de semen (normalmente 0,05 - 0,5 ml) en el lumen oviductal. En un estudio se inseminaron nueve cerdas usando la inseminación laparoscópica. Dos de cada nueve (22%) cerdas se quedaron preñadas a partir de una única inseminación. Un estudio más reciente en la oveja determinó los efectos de la cantidad de espermatozoides, el tiempo y el lugar de inseminación en la fertilidad. En el experimento 1, se inseminaron ovejas con 10^4 , 10^5 , 10^6 ó 10^7 espermatozoides. Los óvulos recuperados 48 horas después se clasificaron como fertilizados si se escindieron. Los resultados mostraron que eran fértiles más ovejas después de la inseminación oviductal que después de la intrauterina (del 61 frente al 39%) y con dosis de espermatozoides altas (10^6 y 10^7) mejor que bajas (10^4 y 10^5) para las inseminaciones intrauterinas pero no para las oviductales. Los investigadores de nuestro centro han logrado por primera vez, el uso de O1 para obtener gestaciones en la yegua. Se inseminaron catorce yeguas mediante O1 con 50×10^3 epm y se inseminaron 15 mediante IA intrauterina con 500×10^6 epm. Las tasas de gestación no eran diferentes entre los grupos 3/14 (21,4%) y 6/15 (40%), respectivamente. La inseminación oviductal también se ha usado exitosamente para obtener gestaciones en mujeres y en conejos.

En vacas, el sitio de la deposición seminal durante la inseminación artificial durante las últimas cuatro décadas ha sido el cuerpo uterino. Esta es una técnica aceptable cuando están disponibles cantidades altas de espermatozoides fértiles para la inseminación, pero para equinos (especialmente cuando están disponibles cantidades limitadas de espermatozoides) se ha desarrollado una aproximación alternativa. La inseminación intrauterina profunda es una técnica que se ha usado para obtener gestaciones en reses. En un estudio se compararon las tasas de gestación con IA cuando se depositó el semen en el cuerpo uterino o en ambos cuernos uterinos (inseminación cornual). Las tasas de gestación cuando el semen se depositó en el cuerpo uterino eran del 44,7% comparadas con el 64,6% con la inseminación cornual. Sin embargo, no todos los estudios mostraron una ventaja con esta técnica de inseminación.

Tal como muestra esta invención, se puede producir una congruencia de los procedimientos de sexado de espermatozoides basándose en el contenido de ADN, los clasificadores de células/citómetro de flujo de alta velocidad y los procedimientos para inseminar equinos con menos de veinticinco millones de espermatozoides en total sin comprometer la fertilidad, que puede dar como resultado la posibilidad de una aplicación no quirúrgica viable o incluso con semen sexado en equinos. De manera interesante, en lugar de la inseminación dentro del cuerpo uterino en el que se colocan normalmente estas inseminaciones, se pueden lograr mejores resultados mediante la inseminación profunda dentro del cuerno uterino de la yegua. Por profunda, debe entenderse que la inserción se coloca bien dentro del cuerno uterino. Puede, pero no es necesario hacerse usando el equipo de transferencia de embriones.

Como resultado de la inseminación, por supuesto se desea que se produzca un animal del sexo deseado. Se puede producir este animal de acuerdo con los sistemas discutidos anteriormente con el uso del espécimen de espermatozoides sexados. También debe entenderse que las técnicas de la presente invención pueden encontrar aplicación en otras técnicas tales como la inseminación laparoscópica, inseminación oviductal o similares. Como ejemplos, se han llevado a cabo los experimentos siguientes. Aunque no se usa cada aspecto de las invenciones descritas en el presente documento, y no se muestran todas las mejoras de la realización de la invención, sí se muestran algunas mejoras posibles a través de los aspectos diferentes de la invención.

Yeguas - Se usaron sesenta y una yeguas en ciclo reproductivo normal de razas de caballos ligeros, variando en edad desde 3 hasta 15. Se administró cloprostenol (250/ μ g i.m.) a las yeguas para inducir la luteolisis y se examinaron por palpación y ultrasonografía del tracto reproductivo por vía rectal, cada dos días hasta que se detectó un folículo > 30 mm y después diariamente hasta la ovulación. Una vez que la yegua desarrolló un folículo > 35 mm, se administró de manera subcutánea un implante de hormona de liberación de gonadotropina (GnRH) (acetato de deslorelina 2,2 mg, Ovuplant®, Fort Dodge, IA), y se asignó a 1 de los 3 grupos de tratamiento.

Grupo de tratamiento 1 - Se inseminaron las yeguas en un única ocasión con 500×10^6 epm en un volumen de 20 ml (25×10^6 epm/ml), 40 h (n=9) o bien 34 h (n=11) después de la administración de GnRH. Se depositó el semen en el cuerpo uterino usando una pipeta de inseminación artificial de plástico flexible (IA) (IMV, Francia).

Grupo de tratamiento 2 - Se inseminaron las yeguas en un única ocasión con 25×10^6 epm en un volumen de 1 ml (25×10^6 epm/ml), 40 h (n=13) o bien 34 h (n=8) después de la administración de GnRH. Se depositó el semen en la punta del cuerno uterino, ipsilateral al folículo preovulatorio, usando una pipeta de IA de plástico flexible. Se confirmó la localización de la pipeta dentro del útero mediante ultrasonografía transrectal antes de la deposición del semen.

Grupo de tratamiento 3 - Se inseminaron las yeguas en un única ocasión con 5×10^6 epm en un volumen de 1 ml (5×10^6 epm/ml), 40 h (n=10) o bien 0,2 ml (25×10^6 epm/ml), 34 h (n=10) después de la administración de GnRH. Se inseminaron las yeguas que recibieron 1 ml con una pipeta de IA de plástico flexible, mientras que se inseminaron las yeguas que recibieron 0,2 ml usando una pistola de implante desechable (Veterinary Concepts, Green Valley, WI) que contenía una paja de plástico de 0,5 ml. Se usaron diferentes pipetas de inseminación para optimizar la administración de los dos volúmenes diferentes. Se depositó el semen en la punta del cuerno uterino, ipsilateral al folículo preovulatorio. Se confirmó la localización de las pipetas dentro del útero mediante ultrasonografía antes de la deposición del semen.

Después de la inseminación, se examinaron las yeguas diariamente para determinar el día de la ovulación. Se realizaron exámenes de gestación mediante ultrasonografía en los días 12, 14 y 16 posteriores a la ovulación. Las tasas de gestación no fueron diferentes entre los dos sementales de cría árabes (semental A = 22/31, 71%; semental B = 15/30, 50%) ($P > 0,1$), o entre yeguas apareadas 34 frente a 40 horas después de la administración de GnRH (19/29, 65% y 18/32, 56%, respectivamente) ($P > 0,1$), así que se combinaron los juegos de datos. Tal como se muestra en la tabla 1, las yeguas gestadas con 500×10^6 epm en un volumen de 20 ml tuvieron una tasa de gestación significativamente mayor ($P < 0,05$) que las yeguas gestadas con 25 ó 5×10^6 epm (tabla 1). No existe una diferencia significativa ($P > 0,05$) en las tasas de gestación entre yeguas gestadas con 25×10^6 epm y yeguas gestadas con 5×10^6 epm en un volumen de 1 ó 0,2 ml. Aunque la fertilidad era significativamente mayor con 500×10^6 epm cuando se compara con el grupo 2 (25×10^6 epm), se logró una tasa inicial del 57% con una única inseminación. Esto no era diferente de las tasas de gestación logradas con el grupo 3 (5×10^6 epm), 7/20 (35%).

Tabla 1 Tasas de gestación a partir de una única inseminación

Tabla 1

Nº de espermatozoides progresivamente móviles	% de gestaciones a día 16
500×10^6 en 20 ml	18/20 (90%) ^a
25×10^6 en 1 ml	12/21 (57%) ^b
5×10^6 en 1 ml	3/10 (30%) ^b
5×10^6 en 0,2ml	4/10 (40%) ^b

^{a,b} Los valores con superíndices difieren ($P < 0,05$), (Chi cuadrada)

El tiempo de inseminación relativo a la administración de GnRH se cambió desde 40 hasta 34 h después de GnRH durante el experimento ya que estaban ovulando muchas yeguas antes de la inseminación planeada, y por lo tanto

no se inseminaron. Se excluyeron los datos de 22 ciclos de yeguas (26,5%) ya que ovularon antes de la inseminación planeada (n=11), no ovularon (n=3), o bien ovularon > 4 días después de la administración de GnRH (n=8).

La cantidad óptima de espermatozoides recomendada generalmente por dosis de inseminación es de 500×10^6 epm cada dos días mientras la yegua está en estro. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, se han hecho estudios que no han mostrado disminución en la fertilidad cuando se insemina con 100×10^6 comparado con 500×10^6 espermatozoides móviles. Los estudios con 50×10^6 espermatozoides móviles han mostrado una disminución de la fertilidad cuando se compara con 100 y con 500×10^6 . Otros estudios han mostrado que al incrementar la cantidad de inseminaciones, se incrementa la fertilidad. Desafortunadamente, de algún modo los resultados de estos estudios no han sido consistentes. Por lo tanto la presente invención está dirigida a lograr la cantidad más baja de espermatozoides requeridos para proporcionar tasas de gestación razonables cuando se administran en una única ocasión, próxima a la ovulación.

En el grupo 3, se inseminaron 20 yeguas con 5×10^6 epm en un volumen de 1 ml (5×10^6 epm/ml) (n=10) o bien en un volumen de 0,2 ml (25×10^6 epm/ml) (n=10). Se compararon las tasas de gestación entre los dos subgrupos debido a que se ha comunicado que las tasas de gestación disminuían cuando se diluía el semen hasta una concentración de espermatozoides de $< 25 \times 10^6$ /ml. Sin embargo, en este experimento no hubo diferencia en la fertilidad entre las dos concentraciones de espermatozoides.

Si una yegua ya había ovulado, basándose en la palpación rectal y en el examen por ultrasonido la mañana del día de la inseminación planeada, no se inseminaba. En su lugar, se administró cloprostenol (250 µg) 5 días posteriores a la ovulación para inducir luteolisis y que se pudieran volver a usar. Se finalizaron las gestaciones en el día 16 localizando mediante ultrasonografía transrectal y rompiendo la vesícula embrionaria. Entonces se administró cloprostenol (250 µg, i.m.) para inducir luteolisis y que se pudieran volver a usar.

Se depositó el semen en la punta del cuerno uterino para las dos dosis menores en este experimento. La deposición seminal profunda en el cuerno uterino es particularmente útil cuando se usan cantidades de espermatozoides bajas en un volumen bajo. Se colocó la pipeta de inseminación flexible en el útero por vía vaginal y después se guió lentamente hasta la punta del cuello uterino deseado mediante manipulación suave por vía rectal. Se confirmó la localización de la pipeta mediante palpación transrectal y examen por ultrasonido.

Se llevo a cabo un pequeño estudio adicional al final de la época de apareamiento usando cinco yeguas y uno de los dos mismos sementales. El objetivo del estudio era determinar las tasas de gestación con 25×10^6 epm depositados en el cuerpo uterino. Tres de las cinco yeguas (60%) inseminadas en una única ocasión con 25×10^6 epm 40 h después de la administración de GnRH estaban preñadas a los 16 d.

En resumen, los resultados de estos experimentos mostraron que se logró una tasa de gestación a los 16 días del 57% con una única inseminación, próxima a la ovulación, con 25×10^6 epm cuando se depositaron de manera profunda en la punta del cuerno uterino.

Los objetivos de los siguientes experimentos eran 1) determinar las tasas de gestación tras la inseminación con 25×10^6 espermatozoides sexados, clasificados vivos depositados en la punta del cuerno uterino ipsilateral al folículo preovulatorio y 2) comparar las tasas de gestación para el semen clasificado en un diluyente de leche desnatada con o sin yema de huevo.

Yeguas - Se usaron diecisiete yeguas en ciclo reproductivo normal de razas de caballos ligeros, variando en edad desde 5 hasta 12. Se administró cloprostenol (250 µg i.m.) a las yeguas para inducir la luteolisis y se examinaron por palpación y ultrasonografía del tracto reproductivo por vía rectal cada dos días hasta que se detectó un folículo > 30 mm y después cada día hasta la ovulación. Una vez que la yegua desarrolló un folículo > 35 mm, se le administró de manera subcutánea un implante de hormona de liberación de gonadotropina (GnRH) (acetato de deslorelina 2,2 mg, Ovuplant®, Fort Dodge, IA), y se asignó aleatoriamente a 1 de los 2 grupos de tratamiento.

Grupo de tratamiento A - Se inseminaron las yeguas (n=11) en una única ocasión con $\sim 25 \times 10^6$ espermatozoides clasificados vivos en un volumen de 1 ml (25 millones/ml), 34 h después de la administración de GnRH. Se clasificaron los espermatozoides en un diluyente de semen de leche desnatada comercial (EZ-Mixin, OF, Animal Reproduction Systems, Chino, CA), y se añadió el mismo diluyente después de la centrifugación como un tampón posterior a la centrifuga para ajustar la concentración de espermatozoides hasta 25×10^6 ml. Se depositaron los espermatozoides en la punta del cuerno uterino, ipsilateral al folículo preovulatorio, usando una pipeta de IA de plástico flexible (IMV, Francia). Se confirmó la localización de la pipeta dentro del útero mediante ultrasonografía transrectal antes de la deposición del semen. Se inseminó una yegua con 20×10^6 espermatozoides clasificados vivos debido a la limitación de tiempo con el citómetro de flujo. Una yegua no ovuló y se excluyó del estudio.

Grupo de tratamiento B - Se inseminaron las yeguas (n=10) en una única ocasión con $\sim 25 \times 10^6$ espermatozoides clasificados vivos en un volumen de 1 ml (25 millones/ml), 34 h después de la administración de GnRH. Se inseminó una yegua con 20×10^6 espermatozoides clasificados vivos debido a la limitación de tiempo con el citómetro de flujo. Se clasificaron los espermatozoides en el mismo diluyente de semen comercial más el 4% de yema de huevo y se añadió el mismo diluyente después de la centrifugación como un tampón posterior a la centrifuga para ajustar la concentración de

espermatozoides. Se depositaron los espermatozoides en la punta del cuerno uterino, ipsilateral al folículo preovulatorio, usando una pipeta de IA de plástico flexible. Se confirmó la localización de la pipeta dentro del útero mediante ultrasonografía transrectal antes de la deposición del semen.

5 Después de la inseminación, se examinaron las yeguas diariamente para determinar el día de la ovulación. Se realizaron exámenes de gestación mediante ultrasonografía en los días 12, 14, 16 y 30 posteriores a la ovulación.

10 Recogida y preparación del semen - En este experimento se usaron dos sementales de cría árabes de fertilidad alta conocida, se usó uno de ellos (semental A) en el experimento 1. Se recogió el semen la mañana de la inseminación planeada con una vagina artificial modelo Colorado (Animal Reproduction Systems, Chino, CA) equipada con un filtro de gel en línea. Se evaluaron los eyaculados para determinar el volumen libre de gel, la movilidad y la concentración de espermatozoides. Se diluyó el semen 1:1 en HBGM-3 con BSA y en pocos minutos, se transportó a temperatura ambiente al laboratorio para procesamiento adicional. Se centrifugó el semen durante 10 minutos a 400 x g a 22°C hasta concentrar altamente los espermatozoides. Después de la centrifugación, se aspiró el sobrenadante, dejando un sedimento de espermatozoides fino. Se determinó la concentración de espermatozoides usando un densímetro (Animal Reproduction Systems, Chino, CA) y posteriormente se diluyeron los espermatozoides hasta 400 x 10⁶/ml en HBGM-3 en un volumen total de 1 ml, y se tiñeron con 25 µl de Hoechst 33342 (5 mg/ml de agua). Se prepararon un total de ocho tubos de muestra y se incubaron a 34°C durante 1 hora. A continuación, se diluyeron las muestras teñidas hasta 100 x 10⁶/ml con 3 ml de HBGM-3. Se añadió colorante alimentario (2 µl/ml del 1% FD&C n°. 40 en HBGM-3) a cada uno de los ocho tubos de muestra, dando como resultado un volumen total de 4 ml. Después se filtraron las muestras a través de un aparato de filtro de 1 ml, 40 micrones en tubos de polipropileno de 6 ml y se mantuvo a temperatura ambiente hasta que aproximadamente se clasificaron 25 x 10⁶ espermatozoides vivos para determinar el ADN mediante citometría de flujo. Se usó un láser de argón, que emitía 150 mW a 351 y 364 nm en cada uno de los dos clasificadores de células/citómetro de flujo MoFlo® modificados para la clasificación de espermatozoides, funcionando a 344.737 Pa (50 psi) con HBGM-3 sin BSA como fluido envolvente. Se recogieron los espermatozoides a aproximadamente 900 espermatozoides vivos/segundo en un total de 6 tubos de polipropileno (de 14 ml cada uno) que contenían 4 ml de fluido de captura antes del comienzo de la clasificación de EZ-Mixin® o bien el 4% de yema de huevo en EZ-Mixin®. Cuando estuvieron disponibles dos yeguas para la inseminación en el mismo día, se recogieron los espermatozoides enriquecidos tanto de cromosoma X como de Y. Se mezclaron los contenidos de los tubos cada 30 minutos durante la clasificación. Después de la clasificación, se juntaron los espermatozoides de los dos citómetros de flujo, se colocaron en tubos de centrifugación de 50 ml y se centrifugaron durante 20 minutos a 1200 x g a 22°C. Después se aspiró el sobrenadante hasta un sedimento de espermatozoides de 200 µl, y se añadieron 100 µl de tampón posterior a la cetrífuga de EZ-Mixin® CST (Animal Reproduction Systems, Chino CA) o bien el 4% de yema de huevo-leche desnatada al sedimento y se transfirió hasta un tubo Falcon pesado previamente de 50 ml. Se realizó un recuento en hemocitómetro para determinar la concentración final de espermatozoides/ml. El volumen de espermatozoides en el tubo Falcon x la concentración de espermatozoides/ml igualó la cantidad total de espermatozoides recuperados. Después se diluyeron las muestras hasta un total de 25 x 10⁶ espermatozoides clasificados vivos en un volumen de 1 ml que se usó para la inseminación.

40 Reanálisis de espermatozoides para determinar el contenido de ADN - Se determinó el contenido de ADN relativo de los espermatozoides intactos clasificados usados para la inseminación mediante el análisis citométrico de flujo de los núcleos de los espermatozoides a partir de una muestra que contenía < 0,5 ml de cada uno de los lotes respectivos recogidos al final del día. Se prepararon los núcleos de los espermatozoides a partir de una alícuota de espermatozoides clasificados intactos mediante sonicación durante 3 segundos con un Ultrasonic Dismembrator 60 (Fisher Scientific) ajustado a la posición n°. 2 (aproximadamente de 1 vatio). Se determinó la proporción de espermatozoides que portan el X y que portan el Y ajustando un par de distribuciones gaussianas a los histogramas a partir del detector de 0° (Johnson *et al.*, 1987b). El reanálisis de ADN indicó una pureza de clasificación promedio del 90% para espermatozoides que portan el cromosoma X y del 84% para los que portan el Y para las 17 clasificaciones.

45 Determinación del sexo fetal - Se sexaron los fetos de yeguas preñadas 60-70 días posteriores a la ovulación por medio de ultrasonografía transrectal sin conocimiento del sexo de los espermatozoides clasificados inseminados. Se usó un escáner de ultrasonido a tiempo real (Aloka 500®) equipado con un transductor de 5 Mhz de matriz lineal para la determinación del sexo. Se puede determinar de manera precisa el género fetal (hasta el 99%) en caballos y en reses identificando y localizando el tubérculo genital (Curran, 1998).

50 Análisis estadístico - Se analizaron los datos usando la prueba exacta de Fisher

55 Las tasas de gestación a día 16 se muestran en la tabla 2. Las tasas de gestación no fueron diferentes entre los sementales (semental A = 3/10, 30%; semental B = 5/10, 50%) (P>0,1), así que se combinaron los juegos de datos. No hubo diferencia estadística en las tasas de gestación entre los tratamientos con espermatozoides (EZ-Mixin = 3/10, 30% frente a EY al 4% + EZ-Mixin = 5/10, 50%) (P>0,1) aunque puede que este resultado no siempre sea cierto. Se predijo la razón de sexo fenotípico con precisión perfecta, cinco de cada cinco.

Tres yeguas perdieron su gestación en algún momento entre los 16-60 días posteriores a la ovulación y no se pudo determinar el sexo fetal. Se sometió a eutanasia a una yegua inseminada con espermatozoides que portan el X al día 66 de gestación debido a un problema gastrointestinal. Se detectó un feto hembra fenotípicamente normal (del sexo correcto) en la necropsia.

Tabla 2 Tasas de gestación tras la inseminación con 25×10^6 espermatozoides sexados

Tabla 2

Grupo de tratamiento	Nº. de yeguas inseminadas	Nº. de yeguas preñadas a los 16 d	Nº. de yeguas preñadas a los 60 d	% predicho*		Real	
				♂	♀	♀	♂
♀	10	3°	1	78	89	**	1/1
EZ-Mixin							
4% de EY + EZ-Mixin	10	5°	4	84		87	3/3
<u>1/1</u>							

° Sin diferencia significativa ($P > 0,1$).

*Resultados del reanálisis para determinar el contenido de ADN relativo de alícuotas de poblaciones de espermatozoides que portan el X y el Y.

** Pérdida de gestación antes de la determinación del sexo

RESULTADOS: Se han realizado muchos intentos durante los últimos 80 años para separar los espermatozoides que portan el cromosoma X de los que portan el Y. El único procedimiento no destructivo que tiene una constancia probada de identificar de manera precisa los espermatozoides que portan los cromosomas X y los que portan el Y es la clasificación de células/citometría de flujo, haciendo posible por tanto que se altere la razón de sexo como se desee. Se han separado los espermatozoides mediante clasificación de células/citometría de flujo para obtener la gestación tras la inseminación quirúrgica en las siguientes especies: conejos, cerdos y caballos. Se eligió la inseminación quirúrgica en estos experimentos debido a la necesidad de minimizar las cantidades de espermatozoides debida a la tasa de clasificación de flujo lenta (-100 espermatozoides/segundo) de espermatozoides que portan el X y que portan el Y y de la evidente necesidad de cantidades grandes de espermatozoides para establecer una gestación. La producción de espermatozoides que portan el X y que portan el Y por unidad de tiempo a través de la clasificación de alta velocidad y una boquilla de orientación recién desarrollada han incrementado las tasas de clasificación hasta 10-12 veces sobre las tasas previas. Esta tecnología ha incrementado la cantidad de espermatozoides clasificados por unidad de tiempo y ha permitido a los investigadores obtener gestaciones dando como resultado la inseminación intrauterina no quirúrgica en ovejas y reses.

El presente estudio era el primero en obtener gestaciones viables en el caballo tras la inseminación intrauterina, no quirúrgica con semen sexado. La tasa de gestación a día 16 tras la inseminación de 25×10^6 espermatozoides sexados (40%), no era diferente estadísticamente ($P > 0,1$) de la tasa de las yeguas del experimento 1 inseminadas con 25×10^6 espermatozoides progresivamente móviles, no clasificados (57%). La técnica de inseminación era la misma en ambos experimentos. Se usaron las mismas yeguas y técnicas en ambos experimentos. Además, se llevaron a cabo ambos experimentos durante la misma época de apareamiento, en el mismo momento del año.

Las tasas de gestación experimental iniciales eran ligeramente menores con semen sexado, posiblemente debido a la cantidad de tiempo que lleva clasificar 25×10^6 espermatozoides y a los posibles daños de los espermatozoides durante el procedimiento. En los experimentos, el tiempo promedio para la recogida de semen para inseminación era de 7 horas. En el primer experimento, se inseminaron yeguas casi inmediatamente después de la recogida de semen. El promedio total y la movilidad progresiva para los espermatozoides sexados era del 69 y del 38% respectivamente, y se recogieron un total de 25×10^6 espermatozoides clasificados vivos para la inseminación. El procedimiento de clasificación es un procedimiento muy estresante para los espermatozoides. Los espermatozoides se bombean a través de tubos finos a presión elevada lo que provoca que salgan a -100 km/h, y se almacenan a temperatura ambiente durante horas hasta que se recoge la cantidad adecuada de espermatozoides. Se incuban los espermatozoides durante una hora a 35°C con Hoechst 33342, que tiene una afinidad alta para regiones ricas de AT del ADN y después se exponen a la luz láser ultravioleta a 351 y 364 nm. A diferencia de muchos tintes específicos de ADN, Hoechst 33342 no se intercala en la hélice de ADN. Aunque ninguno de estos procedimientos es propicio para la salud de los espermatozoides, no se ha comunicado un incremento en la incidencia de anomalías genéticas en los cientos de descendientes que se han producido utilizando esta tecnología.

De interés adicional es el hecho de que otros han propuesto otra explicación posible para disminuir las tasas de gestación con semen sexado. Encontraron que se retrasaba el primer ciclo celular en embriones de conejos fertilizados con espermatozoides tratados con Hoechst 33342. Desafortunadamente, no se conoce el mecanismo, pero puede

deberse a la interferencia de las moléculas de colorante mientras se replica o se transcribe el ADN. También se ha documentado la disminución de la supervivencia de embriones en espermatozoides clasificados con flujo.

5 Tres de ocho yeguas (38%) inseminadas con semen sexado perdieron sus gestaciones entre los 16-60 días. Dos de estas hembras desarrollaron vesículas embrionarias que parecían normales hasta el día 16. Después, las vesículas disminuyeron en tamaño hasta que dejaron de estar presentes. Una de estas tres yeguas desarrolló una gestación viable con un feto visible con latido. Se observó que el feto estaba vivo a día 35, pero se perdió al día 50. Con semen no clasificado, reciente, se ha encontrado que la pérdida embrionaria temprana era del 9% al día 14 y hasta del 16% de promedio entre los días 20 y 50. Se usó un procedimiento de tinción y de clasificación de espermatozoides en los presentes experimentos. Es posible que los espermatozoides equinos sean más sensibles a los procedimientos de tinción y de clasificación que los espermatozoides bovinos.

10 En resumen, esta invención ha demostrado por primera vez, que se puede lograr la gestación en las yeguas, y que se pueden obtener potros de sexo predeterminado, mediante deposición de una cantidad baja de espermatozoides en la punta del cuerno uterino de la yegua. El sexado de los espermatozoides de los mamíferos se aleja de ser una técnica de investigación y ahora puede estar disponible para programas de IA equina comerciales. Además, tal como se mencionó y tal como se puede ver a partir de los diversos experimentos, el campo está basado estadísticamente y por tanto se pueden llevar a cabo una variedad de experimentos adicionales para evidenciar adicionalmente la combinación apropiada y las estrategias de limitación.

15 Se pretende que la discusión incluida en esta solicitud sirva como una descripción básica. El lector debe ser consciente de que la discusión específica puede no describir explícitamente todas las realizaciones posibles; muchas alternativas están implícitas.

20 Finalmente, a lo largo de esta memoria descriptiva (especialmente las reivindicaciones) a menos que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprenden" o "comprendiendo" deberá entenderse que implican la inclusión de un elemento o grupo de elementos indicados pero no la exclusión de cualquier otro elemento o grupo de elementos.

25 Realizaciones preferidas de la invención se describen mediante las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino, que comprende las etapas de:
- a. determinar un tiempo estimado de estro de un mamífero equino hembra, teniendo dicha hembra dos cuernos uterinos, teniendo cada cuerno uterino una punta y un folículo;
 - 5 b. recoger células espermáticas equinas de un mamífero equino macho;
 - c. orientar dichas células espermáticas recogidas dentro de un citómetro de flujo para detectar señales fluorescente emitidas desde dichas células espermáticas dentro de dicho citómetro de flujo;
 - d. seleccionar electrónicamente dichas señales fluorescentes emitidas desde dichas células espermáticas dentro de dicho citómetro de flujo;
 - 10 e. determinar la característica de sexo de una pluralidad de dichas células espermáticas equinas dentro de dicho citómetro de flujo;
 - f. clasificar dichas células espermáticas equinas a una tasa de más de 900 clasificaciones por segundo usando dicho citómetro de flujo de acuerdo con la determinación de su característica de sexo;
 - 15 g. seleccionar específicamente un fluido envolvente, de modo que pueda servir de una manera coordinada tanto con el entorno fluido de células pre-clasificadas como con el entorno fluido de células post-clasificadas para dichas células en dicho citómetro de flujo;
 - h. establecer una muestra de inseminación equina que contenga al menos alguna de dichas células espermáticas equinas clasificadas de dicho mamífero equino macho;
 - 20 i. insertar no quirúrgicamente al menos una parte de dicha muestra de inseminación equina en dicho mamífero equino hembra;
 - j. inseminar artificialmente dicho mamífero equino hembra;
 - k. fertilizar al menos un óvulo equino dentro de dicho mamífero equino hembra; y
 - l. producir un mamífero descendiente equino del sexo deseado.
2. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 1, en el que dichas etapas de determinar la característica de sexo de una pluralidad de dichas células espermáticas equinas y de clasificar dichas células espermáticas equinas de acuerdo con la determinación de su característica de sexo comprenden además las etapas de:
- a. teñir dichas células espermáticas equinas;
 - b. concentrar dichas células espermáticas equinas clasificadas;
3. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 2, en el que dicha etapa de clasificar de acuerdo con dicho sexo de dichas células espermáticas equinas comprende la etapa de hacer funcionar un clasificador de células de alta velocidad a una presión de al menos aproximadamente 344.737 Pa (cincuenta libras por pulgada cuadrada).
4. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 2, en el que dicha etapa de clasificar de acuerdo con dicho sexo de dichas células espermáticas equinas comprende la etapa de recoger células espermáticas equinas que tienen la característica de sexo deseada en una solución de leche desnatada.
5. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 1, en el que dicha etapa de establecer una muestra de inseminación equina que contenga al menos alguna de dichas células espermáticas equinas de dicho mamífero equino macho comprende la etapa de establecer una muestra de inseminación equina que contenga al menos alguna de dichas células espermáticas equinas dicho mamífero equino y que tenga un número bajo de dichas células espermáticas equinas con relación a la dosificación de inseminación artificial típica seleccionada del grupo que consta de: una muestra de inseminación equina de no más de aproximadamente cinco millones de células espermáticas y una muestra de inseminación equina de no más de aproximadamente veinticinco millones de células espermáticas.

6. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 5, en el que dicha etapa de establecer una muestra de inseminación equina que contenga al menos alguna de dichas células espermáticas equinas dicho mamífero equino macho comprende la etapa de establecer una muestra de inseminación equina que tenga un volumen seleccionado del grupo: 0,2 ml ó 1 ml.
- 5 7. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 1, en el que dicha etapa de insertar no quirúrgicamente al menos una parte de dicha muestra de inseminación equina en dicho mamífero equino hembra comprende la etapa de insertar al menos una parte de dicha muestra de inseminación equina de manera profunda dentro de al menos uno de dichos cuernos uterinos de dicha hembra cerca de la punta de dicho cuerno uterino.
- 10 8. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 2, en el que dicha etapa de insertar no quirúrgicamente al menos una parte de dicha muestra de inseminación equina en dicho mamífero equino hembra comprende la etapa de insertar al menos una parte de dicha muestra de inseminación equina de manera profunda dentro de al menos uno de dichos cuernos uterinos de dicha hembra cerca de la punta de dicho cuerno uterino.
- 15 9. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 7, en el que dicha etapa de inseminar artificialmente dicho mamífero equino hembra comprende la etapa de inseminar artificialmente dicho equino hembra en una única ocasión próxima a la ovulación.
- 20 10. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 8, en el que dicha etapa de inseminar artificialmente dicho mamífero equino hembra comprende la etapa de inseminar artificialmente dicho equino hembra en una única ocasión próxima a la ovulación.
- 25 11. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 9, y que comprende adicionalmente la etapa de manipular la ovulación de dicho mamífero equino hembra antes de llevar a cabo la etapa de inseminar artificialmente dicho mamífero equino hembra.
- 30 12. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 10, y que comprende adicionalmente la etapa de manipular la ovulación de dicho mamífero equino hembra antes de llevar a cabo la etapa de inseminar artificialmente dicho mamífero equino hembra.
- 35 13. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 11, en el que dicha etapa de manipular la ovulación de dicho mamífero equino hembra antes de llevar a cabo la etapa de inseminar artificialmente dicho mamífero equino hembra comprende la etapa de administrar una hormona de liberación de gonadotropina a dicho mamífero equino hembra.
- 40 14. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 12, en el que dicha etapa de manipular la ovulación de dicho mamífero equino hembra antes de llevar a cabo la etapa de inseminar artificialmente dicho mamífero equino hembra comprende la etapa de administrar una hormona de liberación de gonadotropina a dicho mamífero equino hembra.
- 45 15. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 13, en el que dicha etapa de inseminar artificialmente dicho mamífero equino hembra se lleva a cabo en un tiempo seleccionado del grupo que consta de: aproximadamente treinta y cuatro horas después de dicha etapa de administrar dicha hormona de liberación de gonadotropina a dicho mamífero equino hembra, aproximadamente cuarenta horas después de dicha etapa de administrar dicha hormona de liberación de gonadotropina a dicho mamífero equino hembra y entre aproximadamente treinta y cuatro horas y aproximadamente cuarenta horas después de dicha etapa de administrar dicha hormona de liberación de gonadotropina a dicho mamífero equino hembra.
- 50 16. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 14, en el que dicha etapa de inseminar artificialmente dicho mamífero equino hembra se lleva a cabo en un tiempo seleccionado del grupo que consta de: aproximadamente treinta y cuatro horas después de dicha etapa de administrar dicha hormona de liberación de gonadotropina a dicho mamífero equino hembra, aproximadamente cuarenta horas después de dicha etapa de administrar dicha hormona de liberación de gonadotropina a dicho mamífero equino hembra y entre aproximadamente treinta y cuatro horas y aproximadamente cuarenta horas después de dicha etapa de administrar dicha hormona de liberación de gonadotropina a dicho mamífero equino hembra.
17. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 13, en el que dicha etapa de insertar al menos una parte de dicha muestra de inseminación equina de manera profunda dentro de al menos uno de dichos cuernos uterinos de dicha hembra cerca de la punta de dicho cuerno uterino comprende las etapas de:
- a. establecer una sonda flexible que tenga un recipiente de espermatozoides;

b. colocar dicha sonda flexible en la vagina de dicho mamífero equino hembra;

c. manipular dicha sonda flexible en dicho útero de dicho mamífero equino hembra;

d. guiar dicha sonda flexible dentro de un cuerno uterino de dicho mamífero equino hembra; y

5

e. manipular suavemente dicha sonda flexible por vía rectal mientras se guía de manera profunda dentro de dicho cuerno uterino de dicho mamífero equino hembra hasta una localización profunda dentro de dicho cuerno uterino de dicha hembra cerca de la punta de dicho cuerno uterino.

18. Un procedimiento para producir de manera práctica un mamífero equino tal como se describe en la reivindicación 14, en el que dicha etapa de insertar al menos una parte de dicha muestra de inseminación equina de manera profunda dentro de al menos uno de dichos cuernos uterinos de dicha hembra cerca de la punta de dicho cuerno uterino comprende las etapas de:

10

a. establecer una sonda flexible que tenga un recipiente de espermatozoides;

b. colocar dicha sonda flexible en la vagina de dicho mamífero equino hembra;

c. manipular dicha sonda flexible en dicho útero de dicho mamífero equino hembra;

d. guiar dicha sonda flexible dentro de un cuerno uterino de dicho mamífero equino hembra; y

15

e. manipular suavemente dicha sonda flexible por vía rectal mientras se guía de manera profunda dentro de dicho cuerno uterino de dicho mamífero equino hembra hasta una localización profunda dentro de dicho cuerno uterino de dicha hembra cerca de la punta de dicho cuerno uterino.

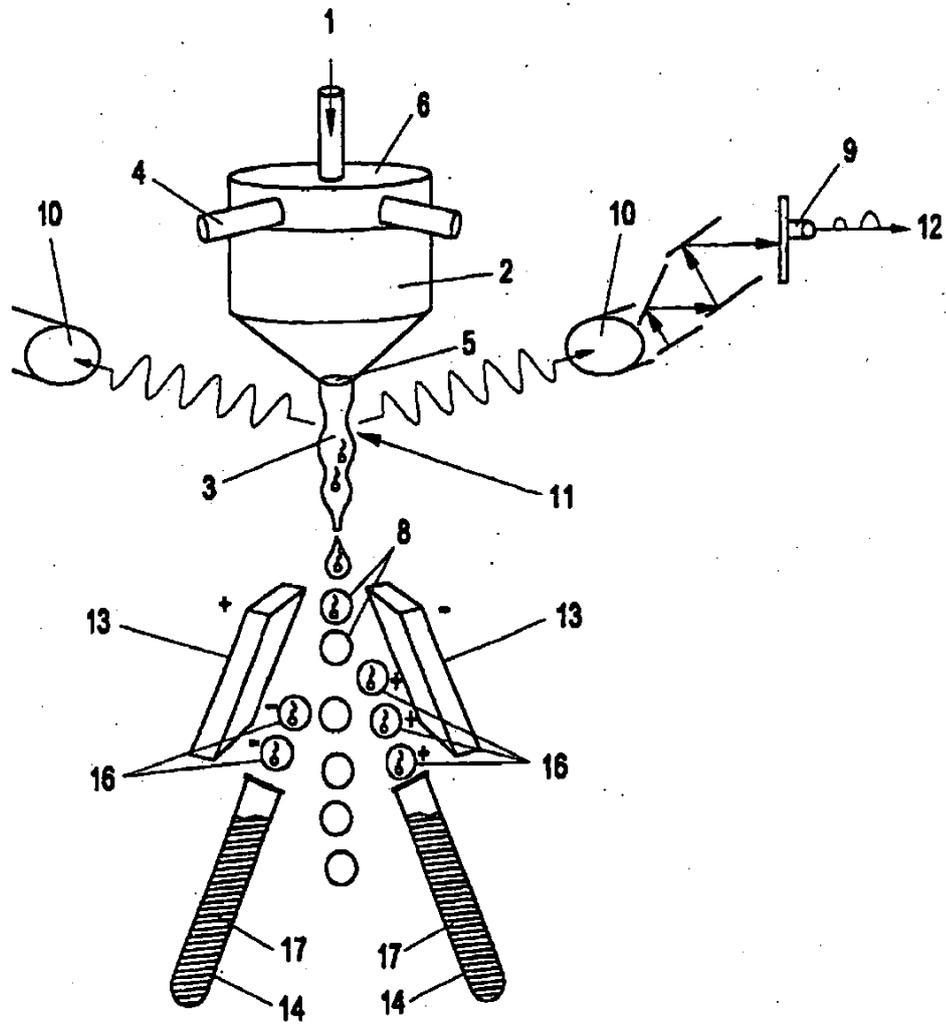


Fig. 1

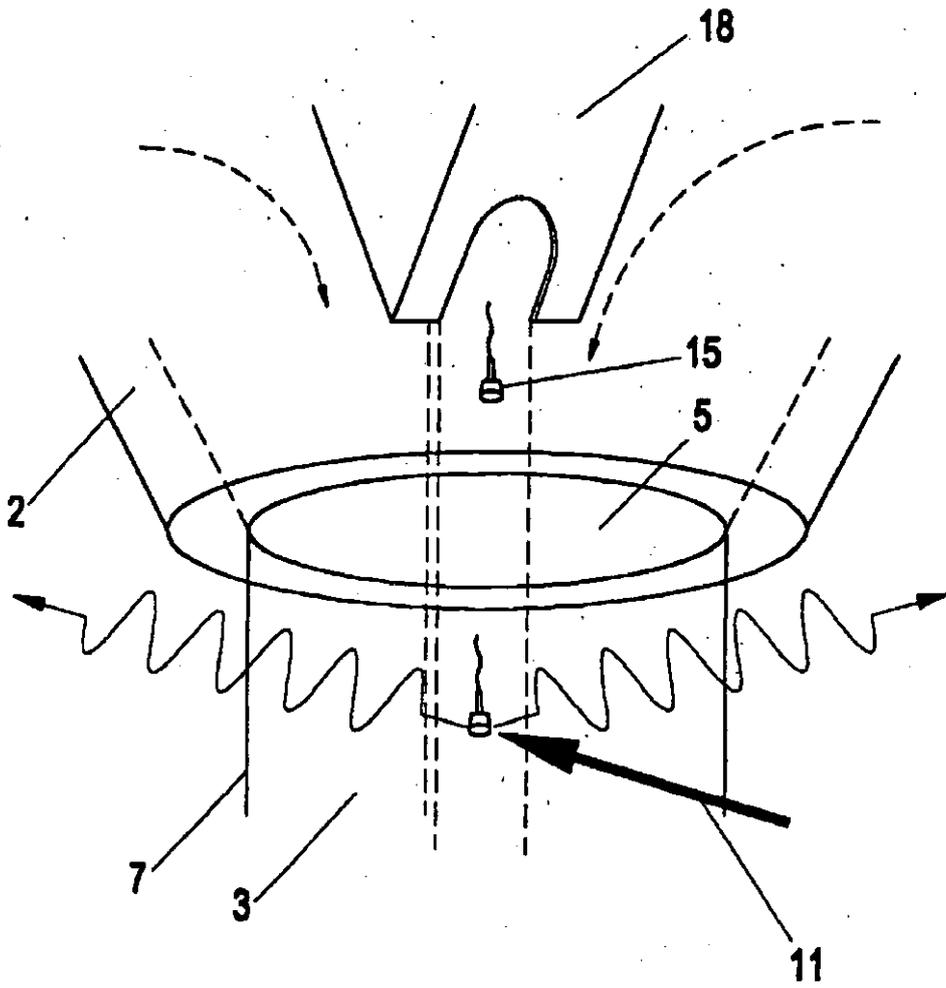


Fig. 2