



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 018**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03795716 .4**

96 Fecha de presentación : **15.09.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1546325**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **Sistemas de conservación y tratamiento de espermatozoides.**

30 Prioridad: **13.09.2002 US 410884 P**
09.01.2003 US 340881

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

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

72 Inventor/es: **Maxwell, William, Maxwell, Chisholm;**
Hollinshead, Fiona, Kate;
O'Brien, Justine, Kellie y
Evans, Gareth

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 018 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

Sistemas de conservación y tratamiento de espermatozoides

REFERENCIAS CRUZADAS A APLICACIONES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de patente de EE.UU. N° 60/410.884, presentada el 13 de septiembre de 2.003 y la solicitud no provisional de patente de EE.UU. N° 10/340.881, presentada el 9 de enero de 2.003.

CAMPO TÉCNICO

10 La presente invención se refiere a conservación de espermatozoides y al tratamiento de espermatozoides, en general. La invención se puede aplicar a inseminación artificial, fertilización in vitro, ovulación múltiple, producción de mamíferos, muestras de esperma y tratamiento de espermatozoides, incluyendo tratamiento tal como elementos de recogida, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La fertilización de óvulos de mamíferos, referidos potencialmente como oocitos, tal como por inseminación artificial y en técnicas de fertilización in vitro se ha dirigido a conseguir aumentar los índices de fertilidad del ganado. Además, la preselección eficaz del sexo se ha llevado a cabo en muchas especies de ganado después del desarrollo de procedimientos seguros y fiables de clasificación, generalmente, o específicamente separación de los espermatozoides en poblaciones enriquecidas portadoras de un cromosoma X y portadoras de un cromosoma Y. La separación de espermatozoides portadores de un cromosoma X de espermatozoides portadores de un cromosoma Y, así como técnicas de recogida, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación o tratamiento de espermatozoides y semen generalmente se puede realizar como se describe en la presente memoria y como se describe en diversas solicitudes de patente, por ejemplo: PCT/US99/17.165; PCT/US01/45.023; PCT/US01/15.150; PCT/US98/27.909; PCT/US01/45.237, PCT/US01/18.879, PCT/US00/30.155, PCT/US01/02.304, Patente de EE.UU. N° 6.071.689, Patente N° 6.372.422, solicitud de patente divisional N° 10/081.955, solicitud de patente divisional N° 60/400.486 y solicitud de patente divisional N° 60/400.971.

25 Aunque los distintos dispositivos y procedimientos de tratamiento de espermatozoides, en general, y la recogida, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización e inseminación de espermatozoides han mejorado durante los últimos años, quedan problemas significativos con respecto al mantenimiento de la calidad del esperma, tal como viabilidad, motilidad y funcionalidad y conservación y estimulación de espermatozoides, especialmente con respecto a procedimientos de inseminación artificial (in vivo) y fertilización in vitro (FIV). Una consecuencia potencial es la reducción en los índices de fertilización. La calidad del esperma, tal como la viabilidad del esperma separado en poblaciones enriquecidas portadoras de un cromosoma X y portadoras de un cromosoma Y, se pudo comparar directamente in vitro (por ejemplo, junto con procedimientos FIV) e in vivo (por ejemplo, junto con procedimientos de inseminación artificial), se reduce en general durante el tratamiento de las espermatozoides tradicional. Más en general, las técnicas de tratamiento tradicionales que estudian la viabilidad, la motilidad, la funcionalidad, la conservación, la estimulación, la fertilización y la inseminación del esperma pueden no haber proporcionado índices de fertilización o calidad del esperma preferida o incluso adecuada, por ejemplo.

30 Como un ejemplo de tratamiento de esperma tradicional, las técnicas de clasificación de espermatozoides para la cría de mamíferos pueden estar limitadas, por ejemplo, con respecto a la calidad de los espermatozoides, tal como viabilidad, motilidad y funcionalidad de los espermatozoides e índices de fertilización así como potencialmente otras características o elementos limitados. Por ejemplo, si el aparato de clasificación está a una distancia relativamente grande de los machos o si el aparato de clasificación está a una distancia relativamente grande de las hembras receptoras que se van a inseminar o los óvulos que se van a fertilizar con esperma tratado, la calidad de los espermatozoides, los índices de fertilización u otras características o elementos se pueden ver afectados perjudicialmente. Algunas de las técnicas o algunas técnicas tradicionales pueden conseguir en cierta extensión viabilidad, motilidad o funcionalidad de los espermatozoides e índices de fertilización deseables, mientras se estudia, por ejemplo, la conservación del esperma durante el transporte al aparato de clasificación. Sin embargo, más técnicas que consiguen suficiente calidad de los espermatozoides, tal como viabilidad, motilidad y funcionalidad y otros elementos tales como estimulación de los espermatozoides, conservación e índices de fertilización mantenidos o mejorados, pueden ser deseables, especialmente para una cualquiera o una combinación de diversas etapas de tratamiento de esperma. Los elementos del tratamiento pueden incluir por ejemplo, recogida, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación y especialmente la conservación de los espermatozoides clasificados desde el aparato de clasificación al sitio de fertilización (potencialmente mediante muestras individuales recogidas o mediante tubos de aspiración o "pajillas") o en cualquier otra fase de tratamiento del esperma.

55 Como otro ejemplo de las limitaciones del tratamiento del esperma tradicional, las técnicas de tratamiento tradicionales pueden estar limitadas con respecto a la calidad de los espermatozoides, en general, tal como viabilidad de los espermatozoides, motilidad y funcionalidad y estimulación de los espermatozoides, conservación de los espermatozoides e índices de fertilización, debido al tipo y la extensión del tratamiento implicado. Las técnicas de

tratamiento conocidas tales como conservación o clasificación, por ejemplo, pueden degradar la calidad del esperma y reducir además los índices de fertilización. La degradación de la calidad del esperma y los índices de fertilización pueden haber resultado previamente problemáticas en circunstancias que pueden haber requerido más etapas de conservación de las espermatozoides, tal como en circunstancias en las que el aparato de clasificación está a relativamente gran distancia de los machos o cuando el aparato de clasificación está a una distancia relativamente grande de las hembras receptoras que se van a inseminar o fertilizar de otro modo con esperma tratado. Sin embargo, la degradación potencialmente identificada de la calidad del esperma y los índices de fertilización puede no haberse estudiado hasta este momento en el contexto de la conservación de las espermatozoides o incluso identificado como referente a la conservación de las espermatozoides o tratamiento de los espermatozoides en general, ya que puede haberse entendido que las técnicas de conservación tradicionales en realidad han contribuido a los efectos perjudiciales para la calidad del esperma, los índices de fertilización u otras características o resultados relevantes.

Se puede haber entendido tradicionalmente que las etapas de tratamiento adicionales en el tratamiento de espermatozoides o semen con una concentración de espermatozoides degradarían la calidad del esperma y reducirían los índices de fertilización hasta tal punto que se evitarían las etapas del tratamiento adicionales en general. Específicamente, también se puede haber entendido tradicionalmente que las etapas de tratamiento tales como conservación, específicamente crioconservación y clasificación podían dañar demasiado los espermatozoides, especialmente en tratamiento de secuencias que incorporan tanto crioconservación como clasificación. Además, incluso se puede haber sugerido y explicado en procedimientos tradicionales que la conservación de esperma tal como crioconservación, proporcionada después de las etapas de tratamiento previas a fin de conservar el esperma para procedimientos posteriores, tal como para técnicas in vivo o in vitro, no se podían realizar sin comprometer los espermatozoides y la propia técnica hasta tal punto que los resultados de los procedimientos posteriores se verían perjudicialmente afectados. De acuerdo con esto, tales preocupaciones se han podido demostrar incluso en procedimientos de tratamiento de espermatozoides tradicionales, que explican lejos de etapas de tratamiento posteriores tales como clasificación y crioconservación o etapas de tratamiento que incorporan múltiples etapas de crioconservación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se puede aplicar a los diversos problemas identificados previamente y potencialmente no estudiados asociados a la calidad reducida de los espermatozoides, tal como viabilidad, motilidad y funcionalidad y estimulación, conservación y otras características o elementos de los espermatozoides. Se estudian además espermatozoides que se pueden haber tratado o que se tratarán mediante una o más etapas de recogida, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación y reducciones potenciales en los índices de fertilización. La invención inmediata también se puede aplicar a la variedad de problemas asociados con la calidad de los espermatozoides de espermatozoides que se han separado en poblaciones enriquecidas portadoras de un cromosoma X y portadoras de un cromosoma Y, potencialmente espermatozoides clasificados por técnicas tales como clasificación de flujo y la potencial reducción en los índices de fertilización. Más en general, la presente invención puede aplicarse a índices de fertilización tradicionalmente bajos de inseminación artificial in vivo y fertilización in vitro y cuestiones de calidad de espermatozoides tal como viabilidad de los espermatozoides, motilidad y funcionalidad. La presente invención también se aplica a cuestiones tales como estimulación, conservación e índices de fertilización así como características de fertilidad mejoradas o mantenidas, tales como índice de desarrollo de blastocitos, capacidad de desarrollo in vivo, índice de preñez y división celular, consiguiéndose resultados que pueden no haber sido esperados por los expertos en la materia. Adicionalmente, la presente invención se aplica a series de esperma tratado potencialmente necesario para obtener índices de preñez deseados y además teniendo en cuenta los índices de preñez obtenidos respectivamente de esperma conservado clasificado y no clasificado.

Naturalmente, más objetos y objetivos significativos de la invención se describen en la siguiente descripción de la invención.

De acuerdo con esto, para conseguir los diversos objetos y objetivos de la invención, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una muestra de esperma de mamífero según la reivindicación 1, comprendiendo las etapas de obtener espermatozoides, crioconservar los espermatozoides, congelar los espermatozoides, tratar los espermatozoides y crioconservar los espermatozoides. También se describe el correspondiente procedimiento de producción de mamíferos y mamíferos y muestras de esperma.

Además, las realizaciones de la invención pueden comprender un procedimiento de tratamiento de espermatozoides y las etapas proporcionadas como obtener espermatozoides, crioconservar los espermatozoides, descongelar los espermatozoides, tratar los espermatozoides y crioconservar los espermatozoides. Además, se describe un procedimiento para producir un mamífero, comprendiendo el procedimiento las etapas de obtener espermatozoides, crioconservar los espermatozoides, descongelar los espermatozoides, clasificar los espermatozoides, crioconservar los espermatozoides, descongelar los espermatozoides, fertilizar al menos un óvulo y producir un mamífero de al menos un óvulo fertilizado, pero no está incluido en el alcance de las reivindicaciones.

Además, para conseguir los diversos objetos y objetivos de la invención, la presente invención puede estar dirigida a

realizaciones que proporcionan procedimientos de inseminación artificial (in vivo) y fertilización in vitro y en algunas realizaciones dirigida a procedimientos de ovulación múltiple. Adicionalmente, las realizaciones pueden estar dirigidas además a establecer muestras de esperma tales como pajillas, gránulos, dosis de inseminación u otras muestras de esperma preparadas y el tratamiento del semen.

- 5 Se describen realizaciones adicionales de la invención por la descripción de la invención y en las siguientes reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama de flujo de una realización de la presente invención.

La Figura 2 es un diagrama de flujo de una segunda realización de la presente invención.

- 10 La Figura 3 es un diagrama de flujo no incluido en el alcance de las reivindicaciones.

La Figura 4 es un diagrama de flujo de una realización de la presente invención.

La Figura 5 es un diagrama de flujo no cubierto por el alcance de las reivindicaciones, proporcionado potencialmente junto con la realización de la Figura 1.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

- 15 La presente invención describe tratamiento de semen y de espermatozoides y técnicas de conservación y conservación, estimulación, fertilización e inseminación que apliquen una o más características de las espermatozoides o calidad del esperma, tal como viabilidad de los espermatozoides, motilidad y funcionalidad y estimulación, conservación e índices de fertilización. Las realizaciones de la presente invención describen además características de fertilidad mejoradas o mantenidas, tales como índice de desarrollo de blastocitos, capacidad de desarrollo in vivo, índice de preñez o división celular. Las características de los espermatozoides o la calidad del esperma se pueden aplicar dentro del contexto de diversas técnicas de tratamiento, tales como recogida, manipulación, separación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación.
- 20

- La calidad de los espermatozoides puede ser uno cualquiera o una combinación de los diversos atributos de los espermatozoides previamente mencionados o mencionados además en la presente memoria, tal como, por ejemplo, viabilidad, motilidad y funcionalidad y se puede considerar incluso una o una combinación de características de fertilidad de los espermatozoides. Las características de los espermatozoides se pueden referir a una cualquiera o a una combinación de diversos atributos biológicos, químicos, físicos, fisiológicos o funcionales de uno o más espermatozoides, tales como atributos de la célula de soporte de cromosomas o en algunas realizaciones se pueden referir a calidad de los espermatozoides como se ha descrito anteriormente.
- 25

- 30 Las características de fertilidad se pueden mejorar o mantener, y pueden comprender índices de desarrollo de blastocitos, capacidad de desarrollo in vivo, índice de preñez o división celular.

- Las técnicas de tratamiento de semen o de espermatozoides se pueden referir a una cualquiera o a una combinación de conservación, estimulación, inseminación, fertilización, clasificación, selección, separación o descongelación y se pueden dirigir específicamente a una cualquiera o a una combinación de técnicas de recogida, manipulación, selección, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación.
- 35

Las muestras de esperma se pueden referir a un volumen, que contiene espermatozoides, que comprende potencialmente semen, fluido portador u otros materiales y puede comprender una o una pluralidad de gránulos, pajillas, dosis de inseminación u otras muestras de esperma preparadas.

- Los espermatozoides se pueden mantener o mejorar según la presente invención y en algunas realizaciones proporcionadas como conservación de espermatozoides o más ampliamente, tratamiento de espermatozoides, tal como por etapas de tratamiento como en clasificación de espermatozoides o conservación de espermatozoides y se puede expresar de acuerdo con técnicas de fertilización e inseminación. Las realizaciones pueden comprender algunos elementos de componentes de conservación de espermatozoides u otras técnicas de tratamiento como se puede describir en las patentes y en solicitudes de patente mencionadas previamente y como se describe además más adelante.
- 40
- 45

También se pueden mantener o mejorar espermatozoides en algunas realizaciones por técnicas de conservación y estimulación como se describe además más adelante y también junto con además las técnicas de tratamiento, estimulación, conservación, fertilización e inseminación en las solicitudes de patente y las patentes mencionadas previamente.

- 50 De acuerdo con esto, la presente invención se expresa como procedimientos de tratamiento de espermatozoides según la reivindicación 1. Con referencia a la figura 1, las etapas de tratamiento de espermatozoides de algunas realizaciones se muestran en el diagrama de flujo. Se obtienen los espermatozoides 10 y se crioconservan los espermatozoides 20. Después se congelan 14 los espermatozoides y se realiza una etapa posterior de

crioconservación 16. Cada uno de estos elementos se describe además a continuación. Una realización del tratamiento de espermatozoides de la invención consistente con los elementos mostrados en la Figura 1 se muestra en la Figura 2. La realización proporciona las etapas 20, 22, 24 y 26 consistentes con la realización de la Figura 1 y establece además al menos una muestra de esperma. La muestra de esperma puede comprender cualquier muestra de esperma como se ha descrito anteriormente y consistente con la descripción adicional que sigue.

La Figura 3 muestra procedimientos para producir un mamífero no cubiertos por el alcance de las reivindicaciones consistentes con las realizaciones de la Figura 1, ya que puede ser lo más fácilmente identificado en las etapas 30, 32, 34 y 36 de la Figura 3. Los espermatozoides del elemento 36 fertilizan al menos un óvulo 28 y se produce un mamífero 40 de al menos un óvulo. De nuevo, cada uno de estos elementos se describe además a continuación.

La Figura 4 muestra realizaciones de tratamiento de espermatozoides según la presente invención. Como se muestra, y en elaboración adicional en los elementos descritos previamente, los espermatozoides se obtienen 50 de una fuente de mamífero o directamente o en diversas combinaciones de etapas, tales como por un dispositivo de almacenamiento. Los espermatozoides se pueden crioconservar 52. La crioconservación se puede proporcionar como se describió adicionalmente en algunas realizaciones de la invención a continuación. Con posterioridad, se pueden descongelar los espermatozoides 54. Se puede realizar entonces tratamiento 56 adicional en las espermatozoides previamente a otra crioconservación de los espermatozoides 58.

El tratamiento de espermatozoides, en general, y los procedimientos descritos previamente se pueden realizar independientes de las técnicas de inseminación y fertilización o como una parte de y junto con tales técnicas. También se puede realizar cada uno de los procedimientos anteriores respectivos de técnicas de ovulación múltiple.

Los procedimientos de producción de un mamífero se muestran en la Figura 5 no cubiertos por el alcance de las reivindicaciones. Después de tratamiento previo, o como procedimiento con los elementos 50 a 58, al menos un óvulo se puede fertilizar 62. Se pueden descongelar 60 los espermatozoides y se puede realizar la fertilización 62 de al menos un óvulo con los espermatozoides. Entonces se puede producir 64 un mamífero del óvulo fertilizado por los espermatozoides tratados. Se proporcionan etapas de tratamiento adicionales tales como clasificación de los espermatozoides y se realizan preferiblemente después de la primera descongelación (54).

Además, las realizaciones de la invención tales como las descritas previamente soportan técnicas in vivo e in vitro. De acuerdo con esto, una hembra de la especie del mamífero del que se obtiene el esperma puede ser inseminada con los espermatozoides, tales como los espermatozoides tratados previamente o clasificados y espermatozoides crioconservados, cada uno descrito previamente. Las técnicas de inseminación pueden comprender inseminar al menos una hembra con los espermatozoides, con la condición de que puedan estar o descongelados o potencialmente como espermatozoides crioconservados en un estado no descongelado, potencialmente en gránulo u otra configuración de muestra de esperma, como se ha descrito anteriormente. Se pueden preferir muestras de esperma descongelado si, por ejemplo, se tiene que mantener o mejorar la calidad de los espermatozoides como parte del tratamiento de los espermatozoides o la producción de mamíferos. Sin embargo, se podían usar células crioconservadas no descongeladas para inseminación y se prefiere si, por ejemplo, es aceptable una descongelación de los espermatozoides en la hembra y si se desea una reducción de las etapas fuera del útero, tal como para reducir el tratamiento de los espermatozoides. Además, las técnicas de inseminación artificial y fertilización in vitro, en general, se pueden llevar a cabo con células crioconservadas no descongeladas, independientes de o junto con otros elementos del tratamiento tales como descongelación, posteriores etapas de crioconservación, clasificación u otros elementos descritos en el momento presente. También se pueden realizar etapas de tratamiento tales como clasificación de los espermatozoides.

Se puede realizar inseminación con al menos una muestra de esperma tal como las descritas previamente. Al menos se puede fertilizar un óvulo de la hembra y producir un mamífero a partir de al menos un óvulo fertilizado. Según procedimientos in vitro, se puede realizar la fertilización in vitro de al menos un óvulo. Se puede transferir al menos un óvulo fertilizado a una hembra receptora y se puede producir un embrión de mamífero, o se puede producir un mamífero, a partir de al menos un óvulo fertilizado.

También se describen técnicas de ovulación múltiple. Una hembra de una especie de mamífero puede ovular de manera múltiple. Se puede inseminar a la hembra que ha producido múltiples óvulos con los espermatozoides y al menos un óvulo fertilizado. Se puede obtener al menos un óvulo fertilizado de la hembra con múltiples óvulos y se puede fertilizar al menos ese óvulo in vitro. Al menos un óvulo fertilizado se puede transferir a una hembra receptora en técnicas o de inseminación artificial o de fertilización in vitro.

Como se mencionó previamente, los procedimientos de tratamiento de espermatozoides pueden comprender el establecimiento de al menos una muestra de esperma de los espermatozoides. De acuerdo con esto, las realizaciones de la invención pueden comprender procedimientos de tratamiento de espermatozoides consistentes con realizaciones descritas previamente, tal como las mostradas en la Figura 2, estableciendo ese elemento al menos una muestra de esperma de los espermatozoides. En algunas realizaciones, al menos esa muestra de esperma establecida puede ser el objeto de una etapa de crioconservación posterior de manera que al menos se crioconserva una muestra de esperma.

Se puede haber pensado previamente que, conforme a técnicas de tratamiento convencionales, tales espermatozoides tratados y muestras de esperma establecida, no tendrían suficiente calidad de esperma o no serían capaz de fertilización. Algunas realizaciones preferidas de la presente invención, sin embargo, también proporcionan que la muestra de esperma sea capaz de fertilización de al menos un óvulo de un mamífero hembra, como se puede mostrar en las diversas realizaciones descritas más adelante y además la inseminación de tal hembra con al menos una muestra de esperma y en algunas realizaciones, la fertilización de al menos un óvulo de un mamífero hembra con al menos una muestra de esperma. El elemento de muestras de esperma capaces de fertilización se extiende en algunas realizaciones a la capacidad de fertilización de una especie de un mamífero hembra superovulado y la inseminación de tal hembra superovulada con al menos una muestra de esperma. El elemento de muestras de esperma capaces de fertilización también se extiende en algunas realizaciones a la capacidad de fertilización in vitro de al menos un óvulo y la fertilización in vitro de al menos un óvulo con al menos una muestra de esperma. Realizaciones adicionales proporcionan el establecimiento de al menos una muestra de esperma capaz de inseminar al menos un mamífero hembra y la inseminación de al menos dicha hembra con al menos dicha muestra de esperma. La fertilización de una pluralidad de óvulos e incluso la producción de un embrión de mamífero, un embrión que se puede transferir a una hembra receptora y más en general la producción de un mamífero, tal como cría de mamífero, se proporcionan consistentes con la capacidad de fertilización de la muestra de esperma y los elementos adicionales descritos anteriormente. Aplicar la capacidad de la muestra de esperma descrita adicionalmente es producir al menos un animal de un sexo preseleccionado a partir de dichos espermatozoides tratadas crioconservadas. De nuevo, las muestras de esperma se pueden establecer de acuerdo con esto y se pueden configurar como una pajilla, un gránulo, una dosis de inseminación o una muestra de esperma preparada.

Cada una de las realizaciones descritas previamente y las descritas adicionalmente a continuación, se puede considerar que parte de tratamiento de espermatozoides tradicional, la producción de mamíferos, la producción de embrión de mamífero y el establecimiento de muestras de esperma. Se ha considerado tradicionalmente que tal procedimiento de espermatozoides no podía asegurar lo suficiente la calidad del esperma o proporcionar los índices adecuados de inseminación, fertilización o preñez. Sin embargo, y como se ha explicado en las diversas referencias citadas en la presente memoria, los espermatozoides se pueden tratar de hecho para conseguir, por ejemplo, la clasificación de espermatozoides, potencialmente para diferenciar espermatozoides como espermatozoides portadores de un cromosoma X o portadores de un cromosoma Y, en algunos casos para proporcionar la preselección del sexo de un mamífero o embrión de mamífero. La presente invención también proporciona tal tratamiento y en algunas realizaciones preferidas, elementos adicionales de conservación hasta ahora considerados tradicionalmente no factibles comercialmente o incluso posibles, y que proporcionan hasta ahora una solución a las cuestiones previamente identificadas pero no estudiadas.

Hasta ahora, el semen, y en particular los espermatozoides se obtienen y se tratan de otros modos a partir de mamíferos según la presente invención tales como équidos, bóvidos, félicos, ovinos, cánidos, búfalo, bueyes, alce o porcino u otras especies de mamíferos. Además, algunas realizaciones pueden proporcionar obtener y tratar semen o espermatozoides de especies de mamíferos apreciadas, especies de mamíferos en peligro, individuos raros de una especie de mamíferos e incluso especies o individuos zoológicas. El mamífero o embrión de mamífero resultante puede ser producido según las técnicas como se ha descrito anteriormente y como se describe además más adelante. Se pueden establecer muestras de esperma, en algunas realizaciones, como se ha descrito anteriormente.

Las muestras de esperma se crioconservan, tal como por congelación, usando diversas técnicas de conservación tales como congelación en un criodiluyente tamponado con Hepes. Se pueden proporcionar espermatozoides como gránulos o pajillas y se pueden descongelar usando diversas técnicas de descongelación, por ejemplo, con espermatozoides de carnero. Se pueden proporcionar otras muestras de esperma por el tratamiento de espermatozoides y se pueden crioconservar o no cuando se establecen como una muestra de esperma o cuando se proporcionan para inseminar o fertilizar un óvulo.

Uno o más aditivos, individualmente o en combinación, se pueden introducir en el semen, espermatozoides o muestra de esperma. En una realización, se puede introducir un criodiluyente en la muestra de esperma para conservar los espermatozoides. La introducción del aditivo o los aditivos, tal como un criodiluyente, en la muestra de esperma y en algunas realizaciones con como una etapa de crioconservación, referida potencialmente como congelación, puede mantener o mejorar los espermatozoides y puede además mantener o mejorar la calidad del esperma, la calidad de los espermatozoides, tal como viabilidad, motilidad y funcionalidad de los espermatozoides y puede mantener o mejorar la estimulación y los índices de fertilización y potencialmente una o más características de los espermatozoides. En otras realizaciones de la presente invención, un aditivo o aditivos, tales como criodiluyente, individualmente o en combinación, se pueden retirar de la muestra de esperma. La eliminación del criodiluyente u otros aditivos de la muestra de esperma y en algunas realizaciones con etapas de crioconservación, puede mantener o mejorar los espermatozoides y puede además mantener o mejorar la calidad del esperma, tal como mantener o mejorar la viabilidad, motilidad y funcionalidad de los espermatozoides y los índices de fertilización y potencialmente una o más características de los espermatozoides.

Los espermatozoides también se pueden mantener o mejorar en algunas realizaciones de la presente invención como parte de las técnicas descritas y la calidad del esperma se puede mantener además o mejorar tal como

mantener o mejorar la viabilidad, motilidad y funcionalidad de los espermatozoides y potencialmente una o más características de los espermatozoides. Además, los índices de fertilización se pueden mantener al menos e incluso mejorar, según los elementos de la presente invención y como se describe además más adelante. Las características de la fertilización también se pueden mantener o mejorar y en algunas realizaciones se pueden mejorar los índices de desarrollo de blastocitos, al menos mantener o incluso mejorar la fertilización monosperma y al menos mantener e incluso mejorar los índices de escisión. En algunas realizaciones de la invención, la muestra de espermatozoides se puede conservar, como se ha descrito anteriormente, tal como por criopreservación, tal como congelación, u otras técnicas de conservación tales como las descritas en las solicitudes de patente y las patentes mencionadas previamente. La calidad del espermatozoides se mantiene en las realizaciones como se describe además más adelante. El mantenimiento de la calidad del espermatozoides, sin embargo, se debería interpretar que incluye elementos de mejora asociados a los espermatozoides. Por ejemplo, la presente invención puede proporcionar motilidad mejorada, viabilidad mejorada y funcionalidad mejorada de los espermatozoides y en algunas realizaciones los espermatozoides de una muestra de espermatozoides.

De acuerdo con esto, se puede introducir crioprotector u otros aditivos, individualmente o en combinación, en la muestra de espermatozoides para conservar o estimular el espermatozoides. En una realización preferida, la introducción del crioprotector u otros aditivos en la muestra de espermatozoides contribuye a la conservación del espermatozoides por criopreservación, congelación de la muestra de espermatozoides y por lo tanto mantener o mejorar los espermatozoides y mantener además o mejorar la calidad del espermatozoides, tal como al menos mantener o incluso mejorar la viabilidad de los espermatozoides, la motilidad y la funcionalidad y potencialmente una o más características de los espermatozoides. Como se mencionó previamente, el crioprotector u otros aditivos se pueden introducir en la muestra de espermatozoides previamente a la conservación de la muestra o como conservación de la muestra. La muestra se puede tratar después tal como por técnicas de recogida, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación, como se describe en las solicitudes de patente y las patentes mencionadas previamente.

En una realización, el crioprotector u otros aditivos, individualmente o en combinación, se pueden introducir en una muestra de espermatozoides recogida previamente y la muestra es criopreservada, tal como por congelación, y seguido por una descongelación de la muestra y posterior tratamiento, incluyendo técnicas de tratamiento de recogida, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación. Una de esas etapas de tratamiento se puede proporcionar como clasificación y en algunas realizaciones como la separación de espermatozoides portadores de un cromosoma X de espermatozoides portadores de un cromosoma Y, potencialmente en una muestra o muestras de población de alta pureza. Se pueden conseguir diversos beneficios por tal técnica de tratamiento de espermatozoides, incluyendo el mantenimiento de la calidad del espermatozoides. Por ejemplo, diversos procedimientos de clasificación como se describió en las solicitudes de patente y en las patentes mencionadas previamente consiguen una separación de espermatozoides portadores de un cromosoma X de espermatozoides portadores de un cromosoma Y al tiempo que se minimiza el daño a los espermatozoides viables. Además, se pueden eliminar por tales técnicas de separación espermatozoides no viable, contaminación o crioprotector u otros aditivos, por ejemplo. Adicionalmente, otros aspectos de la calidad del espermatozoides se pueden mantener o mejorar, en particular los de la viabilidad de los espermatozoides, la motilidad y la funcionalidad. La muestra de espermatozoides se puede estimular además durante el tratamiento para mantener o mejorar la calidad del espermatozoides como se ha descrito anteriormente. Uno de esos procedimientos de tratamiento del espermatozoides conocido en la técnica se describe en la patente de EE.UU. N° 5.135.759, que describe una técnica de clasificación de citómetro de flujo.

El tratamiento de los espermatozoides se puede llevar a cabo por clasificación de los espermatozoides como se ha descrito anteriormente, o en algunas realizaciones, según el siguiente procedimiento. La clasificación puede comprender, en algunas realizaciones, como una selección de espermatozoides basándose en al menos una característica deseada, potencialmente características de calidad de los espermatozoides tales como viabilidad, motilidad, funcionalidad, estimulación y conservación, o una o una combinación de diversas características de los espermatozoides tales como atributos biológicos, químicos, físicos, fisiológicos o funcionales de uno o más espermatozoides, tales como atributos portadores de un cromosomas de la célula. Los espermatozoides se pueden teñir, preferiblemente con Hoechst 33342 o tinte o colorante similar o junto con tales tintes o colorantes y los espermatozoides se pueden diferenciar basándose en la tinción y la selección. Las células se pueden separar después basándose en la diferenciación y después recogida. Los espermatozoides se pueden tratar así según las diversas técnicas de esas referencias citadas en la presente memoria y en algunas realizaciones preferidas se pueden tratar para comprender así el mantenimiento de la calidad del espermatozoides.

REALIZACIÓN DE EJEMPLO 1

En una realización de una técnica de conservación y tratamiento, se pusieron 200 μ l de espermatozoides descongelados en un gradiente de separación de 2 ml (90 %:45 %) de Puresperm™, una preparación humana, y un diluyente a base de Tris. Las preparaciones de gradiente se centrifugaron después a 1.000 g durante 15 minutos. Se retiró el gránulo post-Puresperm™, diluido lentamente 1:4 con diluyente a base de Tris caliente y se centrifugó a 650 g durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y se tiñó el espermatozoides, se incubó y se clasificó como se ha descrito anteriormente. Se usó el diluyente a base de Tris como el medio de tinción y Androhep® (Minitub, Alemania) más 20 % de yema de huevo como medio de recogida.

El ejemplo anterior es una de las diversas realizaciones de la técnica inventiva, que proporciona conservación de esperma, tal como por crioconservación o congelación, descongelación del esperma, identificación del esperma, tal como por tinción y clasificación del esperma, tal como en poblaciones portadoras de un cromosoma X e Y.

5 Aunque el ejemplo previo proporciona una técnica de conservación de esperma y una técnica de tratamiento de recogida de esperma, conservación, descongelación y separación, se incluyen otras técnicas por y se describen explícitamente en la presente invención. Por ejemplo, una o una combinación de diversas técnicas de recogida, manipulación, separación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación se pueden llevar a cabo como parte de esta presente técnica inventiva. En una realización, se puede recoger esperma, seguido por la separación de espermatozoides portadores de un cromosomas X de espermatozoides portadores de un cromosomas Y. Puede no ser necesaria una etapa de conservación previamente a la separación de espermatozoides, por ejemplo, durante circunstancias en que el aparato de clasificación esta fácilmente disponible después de la recogida de esperma. La muestra o las muestras de esperma clasificadas se pueden conservar después como una etapa adicional y como se ha descrito anteriormente, potencialmente para manipulación, separación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación adicional. La muestra de esperma clasificada se puede estimular además durante el tratamiento para mantener o mejorar la calidad del esperma como se ha descrito anteriormente. El siguiente ejemplo describe un ejemplo de una técnica de tratamiento.

REALIZACIÓN DE EJEMPLO 2

20 Se centrifugaron las muestras clasificadas a 700 g durante 6 min a temperatura ambiente (24 °C). Se retiró el sobrenadante y se pudo usar el esperma clasificado "fresco" para IA o en un sistema FIV; o se extendió el gránulo restante 1:4 con el criodiluyente a base de Hepes, potencialmente el mismo diluyente usado para una crioconservación original del esperma y congelado usando diversas técnicas tales como las descritas previamente y como se describe más adelante. Se descongeló el esperma congelado de nuevo y se clasificó usando procedimientos tales como agitación en tubo de vidrio en un baño de agua a 37 °C y después se pudo usar en un sistema de IA o de FIV.

25 REALIZACIÓN DE EJEMPLO 3

El uso de espermatozoides clasificados a partir de gránulos congelados-descongelados en el mamífero ovino teniendo en cuenta sistemas de fertilización in vitro. El esperma congelado-clasificado y congelado-clasificado-congelado usado en un sistema FIV ovino se diluyó lentamente con 0,5 ml de medio FIV y en algunas realizaciones, usando protocolo FIV ovino y centrifugado en un tubo Falcon con una tapa impermeable a 300 g durante 6 minutos. 30 Se retiró el sobrenadante y el esperma restante se puso rápidamente en el pozo de FIV en una concentración de un millón de espermatozoides móviles/ml. Preferiblemente, se requiere un alto estándar de preparación del medio (es decir, uso de óvulos de menos de 24 horas, ultracentrifugación de los diluyentes de yema de huevo y filtración meticulosa) y de manipulación de las muestras (es decir, temperatura constante).

35 Otras técnicas de conservación, tratamiento, fertilización e inseminación no requieren que se incluya una etapa de separación. Por ejemplo, el esperma se puede recoger, seguido por una etapa de conservación y posterior manipulación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación.

Además, se pueden realizar una o más etapas de conservación como parte de técnicas de conservación, tratamiento, fertilización e inseminación o combinaciones de las mismas, comprendiendo tal conservación en algunas realizaciones crioconservación, tal como por congelación de la muestra de esperma y etapas posteriores de descongelación, que tuvieron lugar antes, al mismo tiempo, o después de otra u otras técnicas de tratamiento. 40

REALIZACIÓN DE EJEMPLO 4

La aplicación de clasificación de esperma para crianza de ganado y flora y fauna puede estar limitada cuando el clasificador está a gran distancia del macho o de los machos, como se ha descrito anteriormente, pero se facilitaría por la clasificación de esperma crioconservado y descongelado, tal como esperma congelado-descongelado (Lu KH et al., Theriogenology 1.999: 52: 1.393-1.405) y crioconservándolo o congelándolo de nuevo. La clasificación de alta pureza con calidad mantenida de esperma de carnero congelado-descongelado se puede conseguir después de tratamiento para retirar el criodiluyente. El objeto de este estudio fue evaluar la capacidad funcional de esperma congelado-descongelado después de clasificación y una segunda etapa de crioconservación/descongelación. Se usó semen congelado de 2 carneros (n=2 eyaculados por carnero) por tratamientos de esperma pos-descongelado comprendió (i) (Control) no clasificado; (ii) clasificado (Congelado-Clasificado) y (iii) clasificado después congelado de nuevo (Congelado-Clasificado-Congelado). Se separó esperma X e Y usando un clasificador de alta velocidad (SX MoFlo(R), Cytomation, CO, USA) después de incubación con Hoechst 33342 y tinte alimentario para eliminar esperma no viable. El análisis de nuevo reveló altos niveles de pureza para muestras enriquecidas en X e Y para todos los tratamientos (87,0 +/-4,5 %). Para FIV, se inseminaron oocitos 472 IVM con 1 x 10(6) esperma motil/ml. 50 Después de 3 h en medio SOF, se transfirieron los oocitos a mitad de la escisión FIV Sydney (Cook(R), QLD, Australia) durante 4 d seguido por medio de blastocitos FIV Sydney (Cook(R)) durante unos 3 d adicionales cultivados en O2 al 5 %: CO2 al 5 %: N2 al 90 %. Se evaluó la escisión de los oocitos a las 24 y 48 h post-inseminación (p. i.) A las 52 h p. i., se tiñeron los oocitos no escindidos con orceína para la evaluación de la 55

maduración y fertilización. Se analizaron datos de 3 replicados mediante las pruebas del Chi-cuadrado y de Fischer, ANOVA. En la inseminación, el % espermatozoides motiles (+/- SEM) fue mayor ($P < 0,001$) para Congelado-Clasificado (85,8 +/- 2,4 %) y Congelado-Clasificado-Congelado (66,7 +/- 7,7 %) que el Control (36,7 +/- 2,1 %). El índice de maduración fue del 95,6 % (451/472). La escisión de los oocitos en un grupo de control partenogénico (sin espermatozoides) fue baja (2/56; 3,6 %). La fertilización polisperma fue baja (9/451; 2,0 %) y no fue diferente entre tratamientos.

Tabla 1. Fertilización y desarrollo temprano de embriones de oocitos después de incubación con espermatozoides de carnero (Control) congelado-descongelado no clasificado, (Congelado-Clasificado) congelado-descongelado y clasificado y (Congelado-Clasificado-Congelado) clasificado después congelado-descongelado. Los valores entre paréntesis son porcentajes.

Tratamiento	Nº de oocitos maduros fertilizados ^d	Nº de oocitos maduros que experimentan escisión después de inseminación		Nº de oocitos escindidos que forman blastocitos		
		24 h	48 h	Día 5	Día 6	Día 7
Control	40 (67,8)	26 (44,1)	36 (61,0)	4 (11,1)	13 (36,1)	16 (44,4) ^e
Congelado-Clasificado	110 (63,6)	67 (38,7)	109 (63,0)	24 (22,1)	34 (31,2)	57 (52,3) ^e
Congelado-Clasificado-Congelado	94 (57,7)	71 (43,6)	91 (55,8)	23 (25,3)	347 (40,7)	59
Congelado				(64,8) ^{bc}		

^aFertilización monosperma, en columna, los valores con diferentes superíndices difieren ($P < 0,05$).

Los índices de fertilización y de escisión fueron tratamientos cruzados altamente consistentes. El índice de desarrollo de blastocitos fue mayor para oocitos fertilizados con espermatozoides Congelado-Clasificado-Congelado que con el de Control. Estos resultados demuestran que el espermatozoides de carnero congelado-descongelado se puede clasificar por sexo para uso o inmediato o futuro en sistema FIV después de una nueva crioconservación.

El ejemplo anterior es una de las diversas realizaciones de la técnica inventiva, que proporciona conservación de espermatozoides, tal como por crioconservación, tal como congelación, descongelación del espermatozoides, clasificación del espermatozoides, tal como en poblaciones portadoras de un cromosoma X e Y, conservación de la muestra clasificada, tal como por crioconservación o congelación e incluyendo además descongelación de la muestra de espermatozoides para uso, tal como para fertilización o inseminación.

Se deberían considerar índices de fertilidad respectivos de procedimientos de conservación y de tratamiento, tal como separación para clasificación por sexo y crioconservación de muestras de espermatozoides como describe el siguiente Ejemplo y junto con crioconservación, descongelación, tratamiento y posterior crioconservación, como se describe en esta descripción.

REALIZACIÓN DE EJEMPLO 5

Se han producido corderos después de inseminación artificial (IA) con números bajos ($2-4 \times 10^6$) de espermatozoides clasificado por sexo crioconservado. Hubo menos ovejas preñadas después de IA con espermatozoides congelado-descongelado clasificado como X o Y (25 %, 15 % respectivamente) que con una dosis comercial de espermatozoides congelado-descongelado no clasificado (54 %). El objeto del presente estudio fue determinar los mínimos números de espermatozoides congelado-descongelado clasificados requeridos para obtener índices de preñez similares a los obtenidos con espermatozoides no clasificados.

Una muestra de espermatozoides de eyaculados únicos de 2 carneros se tiñó, se incubó, se analizó y se clasificó usando un clasificador de células de alta velocidad modificado (MoFlo®, Cytomation, Fort Collins, CO, USA) como se ha descrito anteriormente. Se trató espermatozoides a 15.000-18.000/serc sin clasificación por sexo en tubos de centrífuga de 10 ml empapados previamente con BSA al 1 % en fluido de envoltura que contenía 0,2 ml de medio tamponado con Tris y yema de huevo al 20 % (v/v). Para cada muestra, se clasificaron por sexo $1,3 \times 10^6$ de espermatozoides y se analizó para determinar la pureza. Se extendieron muestras clasificadas y no clasificadas (control) con un diluyente tamponado con zwitteriones que contenía el 13,5 % de yema de huevo y el 6 % de glicerol y se congelaron como 250 μ l de gránulos que contenían 5×10^6 espermatozoides. Se controló el tiempo de estro en ovejas merinas 144 mediante esponjas de progestágenos (FGA, Vetrepharm A/Asia, Sydney) insertados intravaginalmente durante 12 días y una inyección de 400 UI de PMSG (Pregnenol, Vetrepharm A/Asia) en la retirada de la esponja (RE). Treinta y seis horas después se inyectaron a RE a 134 ovejas 40 μ g de GnRH (Fertagyl®, Intervet) para controlar el tiempo de ovulación. Se inseminaron ciento once ovejas en el útero por laparoscopia 57-60 h después de RE con 5, 10, 20 ó 40×10^6 espermatozoides congelado-descongelado clasificado o no clasificado. Se inseminaron treinta ovejas a las que no

se les dio GnRH con una dosis comercial de espermatozoides congelado-descongelado no clasificado. Se inseminaron treinta ovejas a las que no se les dio GnRH con una dosis comercial de espermatozoides congelado-descongelado no clasificado 57-58 h después de RE. Se diagnosticó la preñez mediante ultrasonidos el d53. Los datos se analizaron por Chi-cuadrado.

- 5 La motilidad del espermatozoides después de descongelación fue del 37,8+/-1,78 % (clasificado) y del 42,9+/-0,93 % (no clasificado). Siete de las 13 (53,8 %) ovejas a las que no se dio GnRH quedaron preñadas. De las ovejas tratadas con GnRH la proporción de preñadas se vio afectada por el número de espermatozoides inseminado ($p < 0,05$) pero no por el carnero o el tipo de espermatozoides ($p > 0,05$). Para ovejas inseminadas con espermatozoides congelado-descongelado clasificado o no clasificado (control), el índice de preñez fue mayor para inseminadas de 10 y 40×10^6 que para 5 y espermatozoides 20×10^6 (Tabla 1). Los resultados sugieren que se requería un mínimo de 40×10^6 espermatozoides congelados-descongelados y clasificados, inseminados cerca del momento de la ovulación para obtener índices de preñez comercialmente aceptables.

Tabla 1: La preñez después de inseminación intrauterina de ovejas con espermatozoides de carnero de control congelado-descongelado y clasificado.

Dosis ($\times 10^6$ espermatozoides)	Nº ovejas inseminadas	Nº ovejas preñadas	% ovejas preñadas
5	30	10	33,3 ^a
10	28	16	57,1 ^b
20	29	10	34,5 ^a
40	23	16	69,6 ^a

^{ab}En columnas los diferentes superíndices difieren ($p < 0,05$).

^aEste estudio fue patrocinado por XY, Inc; CO, USA; The Australian Research Council, Vetrephann A/Asia.

15

REALIZACIÓN DE EJEMPLO 6

- La capacidad para clasificar y volver a congelar espermatozoides congelado-descongelado aumentaría significativamente la aplicación potencial de tecnología de tratamiento de espermatozoides tal como tecnología de asignación de sexo del espermatozoides a aplicaciones tales como el manejo de especies. Los espermatozoides de carnero congelado-descongelado, clasificado, congelado de nuevo después descongelado, según algunas realizaciones de la invención, parecen completamente funcionales in vitro con producción de blastocitos mayor que la del espermatozoides congelado-descongelado, no clasificado. (Hollingshead FK et al. 2003 Theriogenology 59 209). Algunas realizaciones pueden ser especialmente útiles para evaluar la capacidad in vitro de embriones producidos in vitro procedentes de espermatozoides congelado-descongelado después de clasificación y una segunda etapa de crioconservación/descongelación.

- 25 Se usó semen congelado de 2 carneros ($n=3$ eyaculados por carnero) con una técnica de la presente invención. Los tratamientos de espermatozoides post-descongelación comprendieron (i) (Control) no clasificado; (ii) clasificado (Congelado-Clasificado) y (iii) clasificado después congelado de nuevo (Congelado-Clasificado-Congelado). Se separó espermatozoides X e Y usando un clasificador de alta velocidad (SX MoFlo®, DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA) después de incubación con Hoechst 33342 y tinte alimentario para eliminar espermatozoides no viable. El análisis de nuevo en algunas realizaciones reveló altos niveles (media \pm SEM) de pureza para muestras enriquecidas en X e Y para todos los tratamientos (89 \pm 1,2 %). El día 6 post-inseminación en una técnica realizada de la invención, se transfirieron 2 embriones (fase de blastocito o mayor) por receptor. Se analizaron datos mediante las pruebas del Chi-cuadrado y de Fischer. La supervivencia de embriones in vivo para esta realización puede ser similar por tratamientos de espermatozoides (28/64, 43,8 % total) y 20 de 23 (87,0 %) de corderos sexados fueron del sexo previsto (Tabla 2). Estos resultados de realizaciones de la invención pueden demostrar alta capacidad de desarrollo in vivo de embriones sexados producidos in vitro procedentes de espermatozoides de carnero congelado-descongelado después de clasificación y una etapa de crioconservación/descongelación y aumento de la aplicación potencial de tecnología de tratamiento de espermatozoides tal como tecnología de sexado.

- 40 Tabla 2: La supervivencia in vivo de embriones producidos in vitro transferidos procedentes de espermatozoides de carnero no clasificado congelado-descongelado (Control), congelado-descongelado y clasificado (Congelado-Clasificado), y congelado-descongelado, clasificado después congelado-descongelado (Congelado-Clasificado-Congelado).

Tratamiento de esperma	Nº receptores	Nº preñeces el Día 20 (%) ^a	Nº preñeces el Día 60 (%) ^b	Nº preñeces perdidos entre el Día 20 y el Día 60 (%)	Nº corderos nacidos/nº de embriones transferidos (%)
Control	8	6 (75,0)	5 (62,5)	1 (16,7)	5/16 (31,3)
Congelado-Clasificado	9	7 (77,8)	5 (55,6)	2 (28,6)	6/18 (33,3)
Congelado-Clasificado-Congelado	17	14 (82,4)	14 (82,4)	0 (0)	17/34 (50,0)

^aDiagnóstico por ensayo de progesterona en sangre. ^bDiagnosticado por ultrasonografía.

5 Se describen además muestras de esperma como se definió previamente, tal como una pajilla y en algunas realizaciones de la invención pajillas usadas en FIV, producidas según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente de la invención, tal como cualquiera de las técnicas de tratamiento, producción de mamíferos, producción de embriones de mamíferos, estimulación, conservación, fertilización e inseminación y ser de la calidad de esperma deseada, motilidad y funcionalidad u otras características o combinaciones de características, tales como las características descritas en la presente memoria, resultantes en potencia en niveles deseables de índices de fertilización y en algunas realizaciones, en particular para mamíferos equinos. La muestra de esperma tal como al menos una o una pluralidad de pajillas, puede ser adecuada en particular para la producción individual de embriones.

10 La invención incluye además diversas técnicas de tratamiento, conservación, estimulación, fertilización, inseminación, como se describe en la presente memoria y como puede comprender además elementos descritos en las solicitudes de patente y en las referencias mencionadas previamente. De acuerdo con esto, los diversos elementos de tratamiento de semen y espermatozoides proporcionados como sistemas de conservación, estimulación, fertilización, inseminación, realizaciones, calidad del esperma estudiado tal como una o más características de los espermatozoides tales como viabilidad, motilidad, funcionalidad o índices de fertilización consistentes con las descripciones de las solicitudes de patente y las referencias mencionadas previamente. Además, las características de los espermatozoides se pueden aplicar en el contexto de diversas técnicas de recogida, manipulación, separación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación y en esas u otras 15 varias realizaciones, dentro del contexto de prueba, ensayo o determinación de los atributos biológicos, químicos, físicos, fisiológicos o funcionales de los espermatozoides. Por lo tanto, los sistemas de la presente invención pueden proporcionar técnicas de tratamiento de espermatozoides, estimulación, conservación, fertilización e inseminación, por ejemplo, incorporando técnicas de clasificación de flujo, técnicas de separación de alta pureza, técnicas de fertilización a dosis baja e inseminación, procedimientos de inseminación heterosperma, tales como evaluar la 20 viabilidad, motilidad o fertilidad comparativa tratada en diversos entornos de presión dentro de un clasificador, por citar sólo unos ejemplos.

25 La descripción, tal como los diversos ejemplos proporcionados para separar espermatozoides portadores de un cromosomas X de espermatozoides portadores de un cromosomas Y y otras técnicas descritas de recogida, manipulación, separación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización e inseminación, no significa que limite la presente invención a cualquier realización particular, o aparato, procedimiento o de otro modo. Las descripciones de los diversos ejemplos no se deberían interpretar limitantes de la presente invención a solo técnicas para clasificación de esperma o sólo técnicas para conservación de esperma. Esta descripción sin embargo se puede entender que incorpora las diversas técnicas en el contexto de las diversas realizaciones de la presente invención. Además, la presente invención se debería considerar que incorpora tales técnicas de tratamiento de esperma, conservación, 30 estimulación, fertilización e inseminación consistentes con los elementos descritos.

35 Como se puede entender fácilmente de lo anterior, los conceptos básicos de la presente invención se pueden realizar de diversas maneras. Implica la conservación de los espermatozoides, el tratamiento de espermatozoides, muestras de esperma, incluyendo ambas técnicas así como dispositivos para realizar tratamiento de espermatozoides. En esta solicitud, diversas técnicas de tratamiento de espermatozoides se describen como parte de los resultados mostrados que se tienen que conseguir mediante los diversos dispositivos descritos y como etapas que son inherentes all uso. Son simplemente el resultado natural de usar los dispositivos como se desea y se describe. Además, al tiempo que se describen algunos dispositivos, se debería entender que éstos no sólo cumplen ciertos procedimientos sino que también se pueden variar en una serie de maneras. De manera importante, como todo lo anterior, todas estas facetas se debería entender como incluidas por esta descripción.

45 Además, cada uno de los diversos elementos de la invención y reivindicaciones también se puede conseguir de diversas maneras. Esta descripción se debería entender que incluye cada una de tales variaciones, sea una variación de una realización de cualquier realización de aparato, un procedimiento o una realización del

5 procedimiento o incluso simplemente una variación de cualquier elemento de éstos. En particular, se debería entender que como se refiere la descripción a elementos de la invención, las palabras para cada elemento se pueden expresar por términos de aparato equivalente o términos de procedimientos-incluso si sólo la función o el resultado es el mismo. Tal equivalente, más amplio, o incluso términos más genéricos se deberían considerar como incluidos en la descripción de cada elemento o acción. Tales términos se pueden sustituir donde se desee hacer explícita la cobertura amplia de manera implícita a la que se da derecho en esta invención.

10 Como sólo un ejemplo, se debería entender que todas las acciones se pueden expresar como un medio para tomar esa acción o como un elemento que causa esa acción. De manera similar, cada elemento físico descrito se debería entender que incluye una descripción de la acción que facilita ese elemento físico. Con respecto a este último aspecto, como sólo un ejemplo, la descripción de un "elemento criopreservado" o "dispositivo criopreservado" o similar se debería entender que incluye la descripción del acto de "criopreservar" – si se discute explícitamente o no y a la inversa, fueron descritos eficazmente del acto de "criopreservación", tal como una descripción se debería entender que incluye descripción de un "criopreservador" e incluso un "medio para criopreservación". Tales cambios y términos alternativos se tiene que entender que están incluidos de manera explícita en la descripción.

15 Además, si se usa o cuando se usa, el uso de la expresión transicional "que comprende" se usa para mantener las reivindicaciones de "extremo abierto" en la presente memoria, según la interpretación de reivindicación tradicional. Así, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se debería entender que el término "comprende" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se desea que impliquen la inclusión de un elemento
 20 indicado o etapa o grupo de elementos o etapas pero no la exclusión de ningún otro elemento o etapa o grupo de elementos o etapas. Tales términos se deberían interpretar en su forma más expansiva a fin de que se proporcione al solicitante la más amplia cobertura legalmente permisible.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero, que comprende las etapas de:
 - obtener espermatozoides de mamífero;
 - crioconservar dichos espermatozoides;
 - 5 descongelar dichos espermatozoides;
 - tratar dichos espermatozoides;
 - y crioconservar dichos espermatozoides;
2. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 1, en el que dicha etapa de tratamiento comprende clasificar dichos espermatozoides.
- 10 3. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 2, en el que dicha etapa de clasificación comprende seleccionar dichos espermatozoides basándose en al menos una característica deseada de los espermatozoides.
4. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 3, en el que dicha etapa de selección comprende teñir dichos espermatozoides basándose en al menos una característica deseada de los espermatozoides.
- 15 5. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 4, en el que dicha etapa de selección comprende además diferenciar dichos espermatozoides basándose en dicha al menos una característica de las espermatozoides deseada.
6. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 5, en el que dicha etapa de diferenciación comprende diferenciar dichos espermatozoides como un espermatozoide portador de un cromosoma X o un espermatozoide portador de un cromosoma Y.
- 20 7. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 5, en el que dicha etapa de selección comprende además separar dichos espermatozoides que tienen dicha al menos una característica de los espermatozoides deseada.
8. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en las reivindicaciones 5 ó 7, que comprende además la etapa de recoger dichos espermatozoides.
- 25 9. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 2, en el que dicha etapa de clasificación comprende clasificación con citómetro de flujo.
10. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 1, que comprende además la etapa de establecer una muestra de esperma a partir de dichos espermatozoides tratados.
- 30 11. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 10, en el que dicha segunda etapa de crioconservación comprende crioconservar dicha muestra de esperma.
12. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 10, en el que dicha etapa de establecimiento de una muestra de esperma comprende establecer una pluralidad de muestras de esperma y en el que dicha segunda etapa de crioconservación comprende crioconservar dicha pluralidad de muestras.
- 35 13. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 1, que comprende además la etapa de establecer una muestra de esperma de dichos espermatozoides crioconservados tratados.
14. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 1, que comprende además la etapa de descongelar dichos espermatozoides crioconservados tratados.
- 40 15. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 14, que comprende además la etapa de establecer una muestra de esperma a partir de dichos espermatozoides descongelados, crioconservados y tratados.
16. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 13, en el que dicha etapa de establecimiento de una muestra de esperma comprende establecer una pluralidad de muestras de esperma.
- 45 17. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 15, en

el que dicha etapa de establecimiento de una muestra de esperma comprende establecer una pluralidad de muestras de esperma.

5 18. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 1, en el que dicha etapa de obtención comprende obtener semen con una concentración de espermatozoides, en el que dicha etapa de crioconservación comprende crioconservar dicho semen y en el que dicha etapa de descongelación comprende descongelar dicho semen crioconservado.

19. Un procedimiento de tratamiento de espermatozoides de mamífero como se describe en la reivindicación 1, en el que dicha etapa de obtención comprende obtener espermatozoides de especies zoológicas.

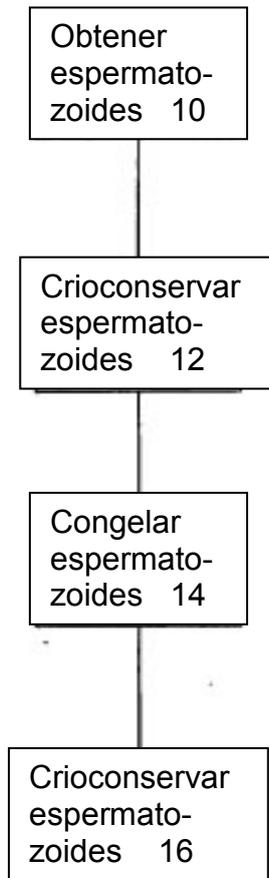


FIG. 1

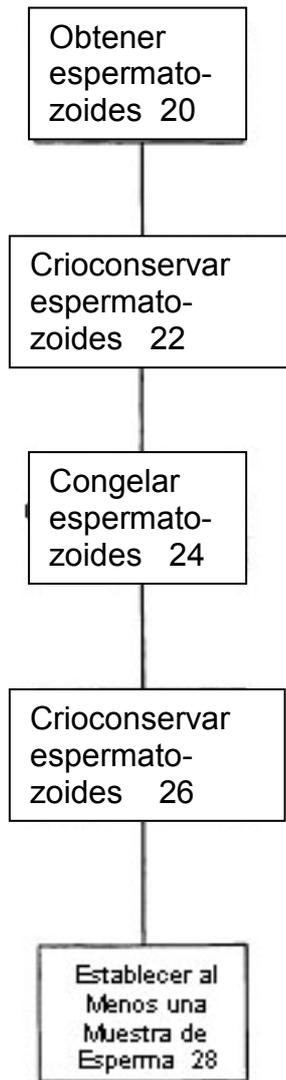


FIG. 2

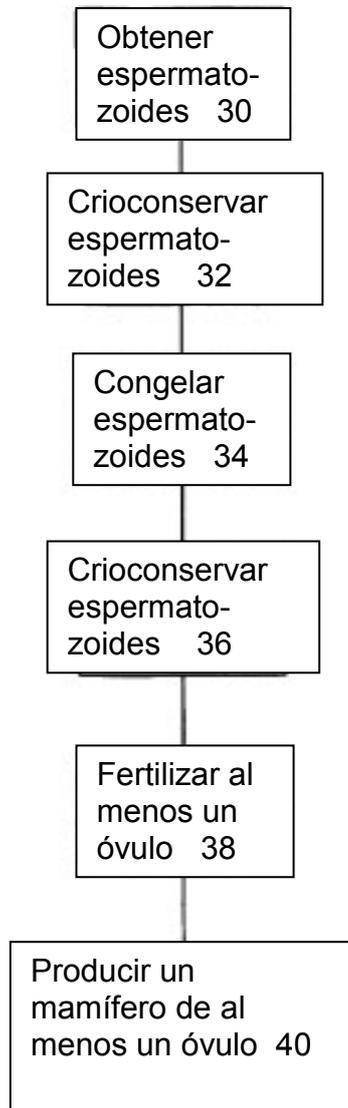


FIG. 3

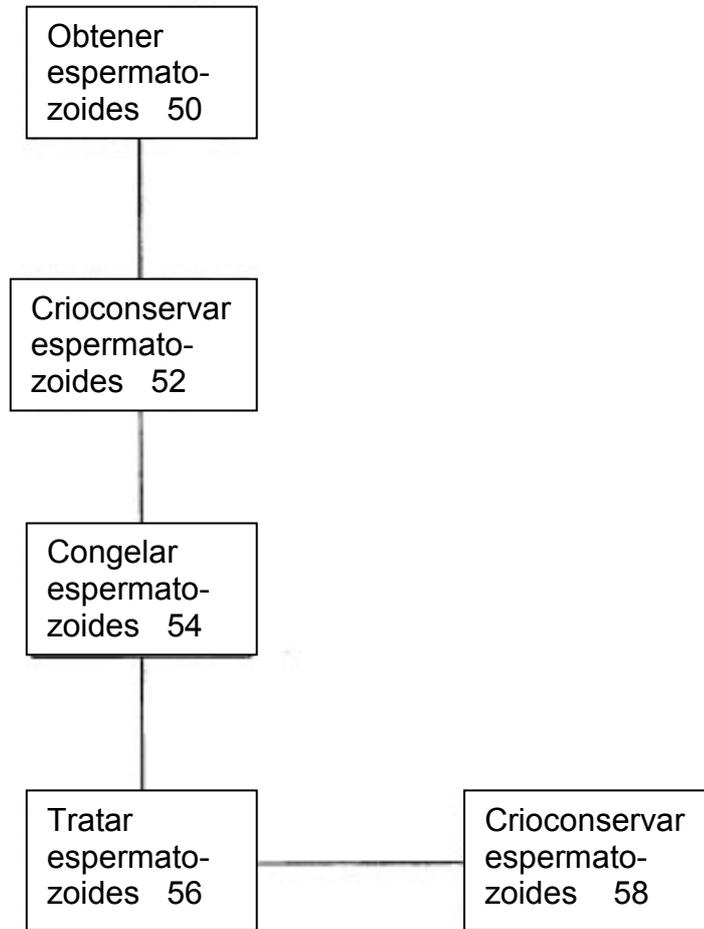


FIG. 4

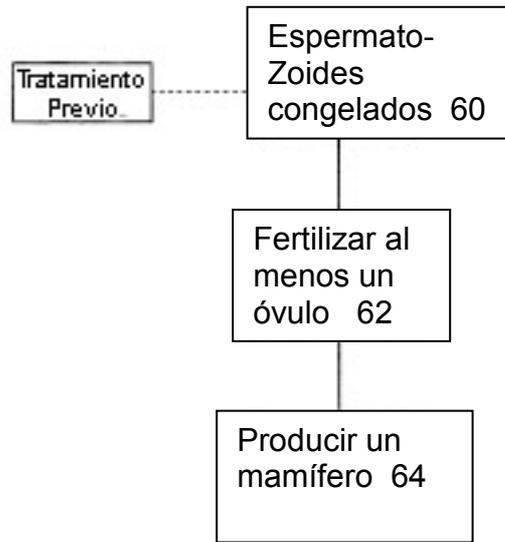


FIG. 5