

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 678**

51 Int. Cl.:

A61K 35/52 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2005 E 09014128 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2151243**

54 Título: **Suspensiones de espermatozoides para clasificación en poblaciones enriquecidas portadoras del cromosoma X o Y**

30 Prioridad:

29.03.2004 US 557407 P

29.09.2004 US 614178 P

13.10.2004 US 618440 P

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

08.03.2013

73 Titular/es:

**INGURAN, LLC (100.0%)
22575 STATE HIGHWAY 6 SOUTH
NAVASOTA, TX 77868, US**

72 Inventor/es:

**LUDWIG, CINDY L.;
CROWLEY, KATHLEEN S. y
GRAVES, CHARLES N.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 397 678 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

Suspensiones de espermatozoides para clasificación en poblaciones enriquecidas portadoras del cromosoma X o Y

5 La presente invención se refiere en general a un proceso de producción de una suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género que produce una suspensión de células espermáticas enriquecidas en género. De modo más específico, la presente invención se refiere a la preparación de suspensiones de células espermáticas que tienen motilidad reducida, y más particularmente una motilidad temporalmente reducida, con relación a los espermatozoides endógenos eyaculados, teniendo las suspensiones utilidad, por ejemplo, en un proceso de
10 clasificar células espermáticas en una población enriquecida de células espermáticas portadoras del cromosoma X o Y.

La fertilización de los animales por inseminación artificial (AI) y el trasplante de embriones subsiguiente a la fertilización in vitro es una práctica establecida. En la industria de producción de ganado, la posibilidad de influir en el resultado reproductivo hacia descendencia que tenga una o más características deseadas presenta ventajas obvias. A modo de ejemplo, se conseguiría un beneficio económico en la industria láctea preseleccionando la descendencia a favor del sexo femenino para asegurar la producción de vacas lecheras. La separación de los espermatozoides en poblaciones enriquecidas de células portadoras del cromosoma X e Y, conocidas como semen enriquecido en género o espermatozoides enriquecidos en género, es un método de consecución de descendencia
15 preseleccionada.
20

Con objeto de obtener semen enriquecido en género, las células espermáticas deben teñirse con un tinte y clasificarse subsiguientemente en células portadoras de cromosoma X e Y. Cada uno de los procesos de tinción y clasificación causa un estrés en las células espermáticas que reduce la viabilidad o motilidad de las células espermáticas, particularmente la motilidad progresiva.
25

Salisbury et al. describen una técnica para la recogida de semen de bovino eyaculado directamente en un diluyente que inhibe la motilidad celular y previene la absorción de carbohidratos del plasma seminal circundante. Cuando el eyaculado se recoge en el diluyente y la fase de aire por encima del líquido se reemplaza por gasificación con 100% CO₂, las células en el eyaculado se vuelven inmóviles. Mientras las células se mantenían en el diluyente y se excluía el aire, las células permanecían inmóviles durante varias horas a la temperatura ambiente y durante al menos 8 días a 5°C.
30

WO 02/41906 se refiere a un método de clasificación de células espermáticas para producir subpoblaciones enriquecidas en espermatozoides portadores de determinantes de cromosomas para descendencia masculina o femenina. En dicho método, las células espermáticas se exponen a cambios en temperatura y pH que afectan a la eficiencia de tinción y separación y la viabilidad (motilidad) de las células espermáticas.
35

La presente invención está dirigida a un método de producción de una suspensión de células espermáticas no humano enriquecidas en género como se caracteriza en la reivindicación 1.
40

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 1 en donde la motilidad progresiva porcentual de células espermáticas se mide para células espermáticas teñidas con tinte Hoechst 33342 600 µM a 28°C en TCA que contiene piruvato 10 mM o en TCA protegido con atmósfera de dióxido de carbono que contiene piruvato 10 mM.
45

La FIGURA 2 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 1 en donde la motilidad progresiva porcentual de las células espermáticas se mide para células espermáticas teñidas con tinte Hoechst 33342 600 µM a 28°C en TCA que contiene piruvato 10 mM o un inhibidor basado en carbonato a pH 7,3.
50

La FIGURA 3 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 1 en donde la motilidad progresiva porcentual de las células espermáticas se mide para células espermáticas teñidas con tinte Hoechst 33342 600 µM a 28°C en TCA que contiene piruvato 10 mM o un inhibidor basado en carbonato a pH 6,2.
55

La FIGURA 4 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 2 en donde la motilidad progresiva porcentual de las células espermáticas se mide para células espermáticas teñidas con tinte Hoechst 33342 1000 µM a 28°C en TCA que contiene piruvato 10 mM y diluidas luego 1 a 3 con TCA que contiene piruvato 10 mM o un inhibidor basado en carbonato a pH 6,2.
60

La FIGURA 5 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 2 en donde la motilidad progresiva porcentual de las células espermáticas se mide para células espermáticas teñidas con tinte Hoechst 33342 1000 µM a 28°C en (1) TCA que contiene piruvato 10 mM y diluidas 1 a 3 con el mismo o (2) un tampón basado en carbonato a pH 7,3 y diluidas 1 a 3 con inhibidor basado en carbonato a pH 6,2.
65

La FIGURA 6 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 2 en donde la motilidad progresiva porcentual de las células espermáticas se mide para células espermáticas teñidas con tinte Hoechst 33342 1000 μM a 28°C en TCA que contiene piruvato 10 mM o un inhibidor basado en carbonato a pH 6,2.

5 La FIGURA 7 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 3 que no cae dentro del alcance de la presente invención, en donde la motilidad progresiva porcentual de las células espermáticas se mide para células espermáticas teñidas con tinte Hoechst 33342 300 μM a 41°C en TCA que contiene piruvato 10 mM y diluidas luego en ratio 1 a 3 con TCA que contiene piruvato 10 mM o con un inhibidor basado en carbonato a pH 6,2.

10 La FIGURA 8 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 3 que no cae dentro del alcance de la presente invención, en donde la motilidad progresiva porcentual de las células espermáticas se mide para células espermáticas teñidas con tinte Hoechst 33342 300 μM a 41°C en (1) TCA que contiene piruvato 10 mM y diluidas 1 a 3 con el mismo o (2) un tampón basado en carbonato a pH 7,3 y diluidas 1 a 3 con inhibidor basado en carbonato a pH 6,2.

15 La FIGURA 9 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 3 que no cae dentro del alcance de la presente invención, en donde la motilidad progresiva porcentual de las células espermáticas se mide para células espermáticas teñidas con tinte Hoechst 33342 300 μM a 41°C en TCA que contiene piruvato 10 mM o un inhibidor basado en carbonato a pH 6,2.

20 La FIGURA 10 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 4 que no cae dentro del alcance de la presente invención, en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte Hoechst 33342 400 μM a 41°C en un tampón de TCA que contiene piruvato 10 mM.

25 La FIGURA 11 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 5 que no cae dentro del alcance de la presente invención, en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte Hoechst 33342 400 μM a 41°C en un tampón de TCA o un tampón de TCA que contiene vitamina K 10 μM .

30 La FIGURA 12 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 6 que no cae dentro del alcance de la presente invención, en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte Hoechst 33342 400 μM a 41°C en un tampón de TCA o un tampón de TCA que contiene vitamina K 100 μM .

35 La FIGURA 13 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 7 que no cae dentro del alcance de la presente invención, en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte Hoechst 33342 400 μM a 41°C en un tampón de TCA o un tampón de TCA que contiene ácido lipoico 1 mM.

40 La FIGURA 14 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 8 en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte Hoechst 33342 600 μM a 28°C en un tampón de TCA o un tampón de TCA que contiene piruvato 10 mM.

45 La FIGURA 15 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 9 en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte Hoechst 33342 600 μM a 28°C en un tampón de TCA o un tampón de TCA que contiene vitamina K 100 μM .

50 La FIGURA 16 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 10 en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte Hoechst 33342 600 μM a 28°C en un tampón de TCA o un tampón de TCA que contiene ácido lipoico 1 mM.

55 La FIGURA 17 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 11 en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte Hoechst 33342 600 μM a 28°C en un tampón de TCA, un tampón de TCA que contiene piruvato 2,5 mM, un tampón de TCA que contiene piruvato 10 mM, un tampón de TCA que contiene piruvato 25 mM, y un tampón de TCA que contiene piruvato 50 mM.

60 La FIGURA 18 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 12 en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte SYBR-14 20 μM a 28°C en un tampón de TCA o un tampón de TCA que contiene piruvato 10 mM.

65 La FIGURA 19 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 13 en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte BBC 100 μM a 28°C en un tampón de TCA o un tampón de TCA que contiene piruvato 10 mM.

La FIGURA 20 representa gráficamente los resultados del estudio realizado en el Ejemplo 14 en donde la motilidad progresiva porcentual de los espermatozoides se mide para espermatozoides teñidos con tinte BBC 200 μM a 28°C en un tampón de TCA o un tampón de TCA que contiene piruvato 10 mM.

5 Sorprendentemente, se ha determinado que los espermatozoides que tienen motilidad reducida con relación a los espermatozoides endógenos eyaculados (de la misma especie) tienden a poseer una mayor capacidad para resistir los diversos pasos de proceso asociados típicamente con la clasificación de las células espermáticas en una población enriquecida de espermatozoides portadores de cromosoma X o Y. En una realización preferida, por consiguiente, las poblaciones de espermatozoides enriquecidas en género según la presente invención se pueden
10 preparar para inseminación artificial que tienen un número incrementado de células viables o un número incrementado de espermatozoides móviles, particularmente espermatozoides progresivamente móviles, en una composición posterior a la tinción o posterior a la clasificación.

Según el proceso de la presente invención, se forma una suspensión, a la que se hace referencia a veces como una
15 dispersión, que contiene espermatozoides y una o más composiciones que inhiben la motilidad de los espermatozoides, haciéndose referencia a veces a un estado de motilidad inhibida de este tipo como inmovilidad o quiescencia de los espermatozoides. En una realización preferida, las suspensiones contendrán espermatozoides en una densidad de aproximadamente 1×10^3 espermatozoides/ml a aproximadamente 5×10^{10} espermatozoides/ml de suspensión. Por ejemplo, en una realización las suspensiones pueden contener espermatozoides en una densidad
20 “relativamente baja”, a saber, en una densidad menor que aproximadamente 1×10^7 espermatozoides/ml, con preferencia menor que aproximadamente 1×10^6 espermatozoides/ml, con más preferencia aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 5×10^5 espermatozoides/ml, con más preferencia todavía aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^6 espermatozoides/ml, con más preferencia aún aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^5 espermatozoides/ml, y con preferencia máxima aproximadamente 1×10^5 espermatozoides/ml de suspensión.
25 En una realización alternativa, las suspensiones pueden contener espermatozoides en una densidad “intermedia”, a saber en una densidad de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^8 espermatozoides/ml de suspensión. En una realización alternativa adicional, las suspensiones pueden contener espermatozoides en una densidad “relativamente alta”, a saber en una densidad de al menos aproximadamente 1×10^8 espermatozoides/ml, con preferencia aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 5×10^{10} espermatozoides/ml, con más preferencia
30 aproximadamente $1,5 \times 10^8$ a aproximadamente 2×10^{10} espermatozoides/ml, con más preferencia aún aproximadamente $1,5 \times 10^8$ a aproximadamente 2×10^8 espermatozoides/ml, y con más preferencia todavía aproximadamente $1,5 \times 10^8$ espermatozoides/ml de suspensión. Así, por ejemplo, en una realización la suspensión puede contener al menos aproximadamente $1,25 \times 10^8$, al menos aproximadamente $1,5 \times 10^8$, al menos aproximadamente $1,75 \times 10^8$, al menos aproximadamente 2×10^8 , al menos aproximadamente $2,25 \times 10^8$, al menos
35 aproximadamente $2,5 \times 10^8$, al menos aproximadamente $2,75 \times 10^8$, o incluso al menos aproximadamente 3×10^8 espermatozoides/ml de suspensión. En una realización alternativa, la suspensión puede contener menos de aproximadamente 9×10^5 , menos de aproximadamente 7×10^5 , menos de aproximadamente 5×10^5 , menos de aproximadamente 2×10^5 , menos de aproximadamente 1×10^5 , menos de aproximadamente 1×10^4 , o incluso menos de aproximadamente 1×10^3 espermatozoides/ml de suspensión.

40 La densidad de espermatozoides en las suspensiones de espermatozoides depende de varias consideraciones, que incluyen el método por el cual pueden enriquecerse o clasificarse subsiguientemente las células espermáticas. Por ejemplo, las células espermáticas pueden clasificarse utilizando citometría de flujo como se describe con mayor detalle más adelante. En tal caso, la suspensión de espermatozoides tamponada puede tener típicamente una
45 densidad “intermedia” o “relativamente alta” de espermatozoides. Otras técnicas de clasificación o enriquecimiento pueden beneficiarse de una menor densidad de espermatozoides, tal como una densidad “relativamente baja” de espermatozoides, identificados con un marcador, tal como por ejemplo los tintes e identificadores descritos en esta memoria.

50 En una realización preferida, los espermatozoides en las suspensiones de la presente invención se comportan, en ciertos aspectos, de una manera característica de los espermatozoides epididimarios; por ejemplo, los espermatozoides pueden mantenerse inmóviles y/o pueden tener una tasa menor de respiración endógena y una tasa mayor de glicólisis aerobia en comparación con los espermatozoides lavados o recién eyaculados. Ventajosamente, los espermatozoides inhibidos tienen la capacidad, después de la separación del o de los
55 inhibidores, de comportarse de una manera característica de los espermatozoides eyaculados (y no característica de los espermatozoides epididimarios) con respecto a motilidad y, en una realización, con respecto a motilidad y respiración.

En una realización, por ejemplo, el inhibidor de la motilidad reduce la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o
60 ambas, como se mide por el análisis de esperma HTM-IVOS (sistema de análisis de esperma Hamilton-Thorne HTM-IVOS asistido por computadora de Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA) de al menos aproximadamente el 50% de las células espermáticas en la dispersión con relación a la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Preferentemente, el inhibidor de la motilidad reduce la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas, como se mide por el análisis de esperma
65 HTM-IVOS, de al menos aproximadamente el 60% de las células espermáticas en la dispersión con relación a la

velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Con más preferencia, el inhibidor de la motilidad reduce la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas, como se mide por el análisis de esperma HTM-IVOS, de al menos aproximadamente el 70% de las células espermáticas en la dispersión con relación a la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Con más preferencia todavía, el inhibidor de la motilidad reduce la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas, como se mide por el análisis de esperma HTM-IVOS, de al menos aproximadamente el 80% de las células espermáticas en la dispersión con relación a la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Aún con más preferencia, el inhibidor de la motilidad reduce la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas como se mide por el análisis de esperma HTM-IVOS, de al menos aproximadamente el 90% de las células espermáticas en la dispersión con relación a la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Todavía con más preferencia, el inhibidor de la motilidad reduce la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas como se mide por el análisis de esperma HTM-IVOS, de al menos aproximadamente el 95% de las células espermáticas en la dispersión con relación a la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Muy preferiblemente, el inhibidor de la motilidad reduce la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas, como se mide por un análisis de esperma HTM-IVOS, de al menos aproximadamente el 99% de las células espermáticas en la dispersión con relación a la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie.

Además de o en lugar de un tampón inhibidor, puede reducirse exclusivamente la temperatura de las células espermáticas o el ambiente inmediato que rodea las células espermáticas (a saber, una dispersión de espermatozoides) para afectar a la motilidad de las células. Una reducción de este tipo en la temperatura aumentará generalmente la inmovilidad. Además, por ejemplo, la reducción de la temperatura de las células espermáticas o la dispersión de espermatozoides puede permitir una reducción en la concentración de inhibidor utilizada para inducir la inmovilidad. Según lo anterior, la dispersión de espermatozoides puede encontrarse a una temperatura que no exceda de 5°C; con preferencia entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 5°C; con más preferencia entre aproximadamente 3°C y aproximadamente 5°C, y con preferencia máxima aproximadamente a 5°C. Alternativamente, la dispersión de espermatozoides puede encontrarse a una temperatura comprendida dentro del intervalo de aproximadamente 4°C a aproximadamente 50°C; con preferencia desde aproximadamente 7°C a aproximadamente 43°C; con más preferencia desde aproximadamente 10°C a aproximadamente 39°C; con más preferencia todavía desde aproximadamente 15°C a aproximadamente 30°C; con más preferencia aún desde aproximadamente 17°C a aproximadamente 25°C, y con preferencia máxima a aproximadamente 18°C. Con preferencia, sin embargo, las células espermáticas no se exponen a temperaturas que afecten de modo sustancialmente perjudicial a la viabilidad de las células.

El inhibidor es una composición que comprende iones sodio/potasio y que tiene un efecto depresivo sobre la motilidad de los espermatozoides. Tales composiciones incluyen, por ejemplo, inhibidores de la ATPasa-sodio/potasio, tales como ouabaina. Las concentraciones relativamente altas de iones potasio en la suspensión tienden a deprimir la motilidad de los espermatozoides. En general, por tanto, la suspensión contiene una fuente de iones potasio y se prefiere que la concentración de potasio en la suspensión sea al menos aproximadamente 0,05 moles/l. Con más preferencia, la concentración de potasio es al menos aproximadamente 0,05 moles/l hasta aproximadamente 0,5 moles/l. Con más preferencia todavía, la concentración de potasio es al menos aproximadamente 0,1 moles/l a aproximadamente 0,3 moles/l. Con la máxima preferencia, la concentración de potasio es aproximadamente 0,173 moles/l. Tales suspensiones contendrán también típicamente, pero no con carácter necesario, una fuente de iones sodio. La ratio molar de potasio a sodio es generalmente igual a o mayor que 1:1, respectivamente. Con preferencia, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 1,25:1. Con más preferencia todavía, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 1,5:1. Con más preferencia todavía, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 1,75:1. Con más preferencia todavía, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 1,78:1. En una realización particular, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 2:1. En otra realización adicional, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 3:1. En otra realización adicional, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 4:1. En otra realización adicional, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 5:1. En otra realización adicional, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 6:1. En otra realización adicional, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 7:1. En otra realización adicional, la ratio molar de potasio a sodio es al menos aproximadamente 8:1.

La suspensión de espermatozoides puede comprender adicionalmente un ion o fuente de dióxido de carbono capaz de regular en sentido decreciente la absorción de carbohidratos. En esta realización, la fuente de dióxido de carbono puede ser, por ejemplo, uno o más carbonatos. En una realización actualmente preferida, la suspensión de espermatozoides comprende NaHCO_3 y KHCO_3 , proporcionando de este modo una fuente de iones potasio y sodio así como una presión parcial de dióxido de carbono. Por ejemplo, en una realización actualmente preferida, la suspensión comprende NaHCO_3 y KHCO_3 en una solución acuosa, preferiblemente NaHCO_3 , KHCO_3 , y $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua. En general, la concentración de KHCO_3 en la dispersión puede ser al menos aproximadamente 0,05 moles/l. Con más preferencia, la concentración de KHCO_3 es al menos aproximadamente 0,05 moles/l a

aproximadamente 0,5 moles/l. Con más preferencia todavía, la concentración de KHCO_3 es al menos aproximadamente 0,1 moles/l a aproximadamente 0,3 moles/l. En una realización particularmente preferida, la suspensión se forma utilizando un tampón inhibidor que comprende 0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 , 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua como se expone en Salisbury & Graves, J. *Reprod. Fertil.*, 6:351-359 (1963). Las células espermáticas se mantendrán generalmente quiescentes mientras estén expuestas al inhibidor o inhibidores de la motilidad.

Cuando está presente $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en la dispersión, la ratio molar de KHCO_3 a NaHCO_3 puede ser como se ha descrito arriba. La ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ puede ser generalmente igual a o mayor que 1:1, respectivamente, pero generalmente no excederá de una ratio molar de 8:1. Con preferencia, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es de al menos aproximadamente 1,25:1. Con más preferencia todavía, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es al menos aproximadamente 1,5:1. Con más preferencia todavía, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es al menos aproximadamente 1,75:1. En una realización particular, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es al menos aproximadamente 1,78:1. En otra realización adicional, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es al menos aproximadamente 2:1. En otra realización adicional, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es al menos aproximadamente 3:1. En otra realización adicional, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es al menos aproximadamente 4:1. En otra realización adicional, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es al menos aproximadamente 5:1. En otra realización adicional, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es al menos aproximadamente 6:1. En otra realización adicional, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es al menos aproximadamente 7:1. En otra realización adicional, la ratio molar de KHCO_3 a $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ es al menos aproximadamente 8:1. En una realización particularmente preferida, la dispersión se forma utilizando un tampón inhibidor que contiene 0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 , 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua como se expone en Salisbury & Graves, J. *Reprod. Fertil.*, 6:351-359 (1963). Las células espermáticas se mantendrán generalmente quiescentes mientras estén expuestas al inhibidor o inhibidores de la motilidad.

Pruebas experimentales obtenidas hasta la fecha sugieren adicionalmente que la salud global y otras características vitales de las células espermáticas pueden mejorarse si las sucesión de células se mantiene en una atmósfera que tenga una presión parcial aumentada de dióxido de carbono con relación al aire. En una realización preferida, la atmósfera sobre la suspensión tiene una presión parcial de dióxido de carbono de al menos 0,9; con más preferencia, al menos aproximadamente 0,95.

Las células quiescentes pueden devolverse a un estado activo separando las células del inhibidor de la motilidad y exponiendo las mismas al aire. Adicionalmente, la iniciación de un estado activo puede inducirse ulteriormente por la dilución de las células en una solución salina fisiológica (Salisbury et al., 1963) o un tampón tal como tampón de TCA o PBS. Según la presente invención, al menos aproximadamente 20%, con preferencia al menos aproximadamente 50%, con más preferencia al menos aproximadamente 60%, con más preferencia todavía al menos aproximadamente 70%, con más preferencia aún al menos aproximadamente 80%, de modo aún más preferible al menos aproximadamente 90%, con más preferencia todavía al menos aproximadamente 95%, y con preferencia máxima al menos aproximadamente 99% de las células devueltas a un estado activo (a saber, células reactivadas) tendrán una velocidad de paso, velocidad progresiva, o ambas, como se mide por el análisis de esperma HTM-IVOS, que es al menos aproximadamente 50%, con preferencia al menos aproximadamente 60%, con más preferencia al menos aproximadamente 70%, con más preferencia todavía al menos aproximadamente 80%, con más preferencia aún al menos aproximadamente 90%, con más preferencia aún al menos aproximadamente 95%, y con preferencia máxima al menos aproximadamente 99% de la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas de las células espermáticas antes de combinarse con el inhibidor de la motilidad (es decir, de las células espermáticas de un eyaculado reciente).

En general, el método reivindicado comprende una serie de pasos discretos, a saber la recogida de una muestra de células, tinción de las células, clasificación de las células, recogida de las células clasificadas, retorno de las células clasificadas a un estado activo y opcionalmente, criextensión de las células clasificadas. Ventajosamente, el inhibidor de la motilidad se incluye en las suspensiones de espermatozoides formadas o empleadas por mezcla de la suspensión de células espermáticas con el inhibidor.

55 Recogida de la muestra de células

Las células espermáticas viables intactas de bovino, porcino, equino, u otro mamífero, pueden recogerse y ponerse en contacto con el inhibidor de la motilidad. Se conocen diversos métodos de recogida de espermatozoides viables que incluyen, por ejemplo, el método de mano enguantada, el uso de una vagina artificial, y electro-eyaculación. Como ejemplo, una muestra de esperma de bovino, que contiene típicamente alrededor de 0,5 a aproximadamente 10 billones de células espermáticas por mililitro, puede recogerse directamente del mamífero fuente en una vasija que contenga un inhibidor de la motilidad para formar una suspensión de espermatozoides. Alternativamente, la muestra de esperma puede recogerse en una vasija vacía y ponerse en contacto posteriormente con el inhibidor de la motilidad en el transcurso de varios minutos a horas después de la recogida para formar la suspensión de espermatozoides.

Además de un tampón, la suspensión de espermatozoides puede contener también una serie de aditivos para mejorar la viabilidad de los espermatozoides. Aditivos ilustrativos incluyen fuentes de proteínas, y antibióticos. En cualquier caso, la suspensión de células espermáticas se mezcla con una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción intracelular y/o extracelularmente.

5 Fuentes ilustrativas de proteínas incluyen yema de huevo, extracto de yema de huevo, leche (con inclusión de leche homogeneizada térmicamente y desnatada), extracto de leche, proteína de soja, extracto de proteína de soja, seroalbúmina, seroalbúmina bovina, suplemento sustitutivo de suero humano, y combinaciones de los mismos. Albúmina, y más particularmente seroalbúmina bovina (BSA), es una fuente de proteína preferida. Por ejemplo, si se incluye, BSA puede estar presente en la suspensión de espermatozoides en una cantidad menor que
10 aproximadamente 5,0% (p/v), con preferencia menos de aproximadamente 2% (p/v), con más preferencia menos de aproximadamente 1% (p/v), y con preferencia máxima en una cantidad de aproximadamente 0,1% (p/v).

15 El uso de una fuente de proteína, tal como BSA, sola puede iniciar el proceso de capacitación en un porcentaje de las células espermáticas en la suspensión. Se prefiere que este proceso tenga lugar en el tracto reproductivo de la hembra. Por esta razón, a fin de inhibir la iniciación de la capacitación durante la dilución, así como durante la tinción y clasificación subsiguientes, se puede incluir una fuente de proteína alternativa o un sustituto de proteína en la suspensión de espermatozoides. La fuente de proteína o sustituto de proteína alternativa posee los efectos ventajosos de una fuente de proteína típica, tal como BSA, además de la aptitud para inhibir la iniciación de la
20 capacitación en un mayor porcentaje de las células en la suspensión de espermatozoides. Ejemplos de una fuente de proteína alternativa incluyen suplemento sustitutivo de suero humano (SSS) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y BSA mejorada con colesterol, en tanto que un ejemplo de un sustituto de proteína incluye un poli(alcohol vinílico), tal como por ejemplo, un poli(alcohol vinílico) de viscosidad baja a media, que tiene por regla general un peso molecular de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 60.000. Generalmente, si se incluyen, estas composiciones
25 estarán presentes en las mismas cantidades que se han descrito arriba con respecto a BSA, no excediendo por regla general el contenido total de albúmina del tampón o solución tamponada de aproximadamente 5,0% (p/v).

30 La composición que regula las reacciones de oxidación/reducción intracelular y/o extracelularmente se selecciona del grupo constituido por piruvato, vitamina K, ácido lipoico, glutatión, flavinas, quinonas, superóxido-dismutasa (SOD), y miméticos de SOD. Una composición de este tipo está presente en una concentración suficiente para producir el efecto protector sin afectar perjudicialmente a la salud del espermatozoide. Intervalos de concentración ilustrativos incluyen desde aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 20 mM, dependiendo de factores tales como la composición particular que se utilice o la concentración de espermatozoides en la suspensión. Por ejemplo,
35 el piruvato puede estar presente en la suspensión de espermatozoides en una concentración que va desde aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, con preferencia desde aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, y con más preferencia aproximadamente 10 mM. La vitamina K puede estar presente en la suspensión de espermatozoides en una concentración de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 100 μ M, con preferencia desde aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 100 μ M, y con más preferencia
40 aproximadamente 100 μ M. El ácido lipoico puede estar presente en la suspensión de espermatozoides en una concentración que va desde aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM, con preferencia desde aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1 mM, y con más preferencia aproximadamente 1 mM.

Puede incluirse un antibiótico en la suspensión de espermatozoides a fin de inhibir el crecimiento bacteriano. Antibióticos ilustrativos incluyen, por ejemplo, tilosina, gentamicina, lincomicina, espectinomicina, Linco-Spectin®
45 (hidrocloruro de lincomicina-espectinomicina), penicilina, estreptomycin, ticalcilina, o cualquier combinación de los mismos. Si se incluyen, los antibióticos pueden estar presentes en una concentración de aproximadamente 50 μ g a aproximadamente 800 μ g por ml de esperma, con indiferencia de si el esperma está puro, tamponado, o contiene sustancias adicionales, tales como por ejemplo, cualquiera de los aditivos mencionados en esta memoria. Los Servicios de Esperma Certificado (CSS) y la Asociación Nacional de Criadores de Animales (NAAB) han promulgado
50 directrices relativas al uso de antibióticos con respecto a la recogida y uso del esperma.

Puede añadirse un factor de crecimiento a la dispersión de espermatozoides a fin de ayudar a mantener la viabilidad de los espermatozoides. Factores de crecimiento ilustrativos incluyen, por ejemplo, factores del crecimiento transformante ("TGF"), tales como, por ejemplo, TGF β -1 y TGF β -2, y factores de crecimiento semejantes a insulina ("IGF"), tales como, por ejemplo, IGF-1. Por regla general, TGF puede estar presente en la dispersión de
55 espermatozoides en la forma de TGF β -1 en una concentración de aproximadamente 0,1 ng/l a aproximadamente 10 μ g/l, o como TGF β -2 en una concentración de aproximadamente 0,1 ng/l a aproximadamente 200 ng/l, e IGF puede estar presente en la dispersión de espermatozoides en la forma de IGF-1 en una concentración de aproximadamente 0,1 ng/l a aproximadamente 50 μ g/l. el uso de tales factores de crecimiento es bien conocido en la técnica y se expone, por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0157473, cuyo
60 contenido se incorpora por la presente en esta memoria por referencia.

Una vez recogidas, las células pueden guardarse en estado quiescente durante varias horas a la temperatura ambiente, durante varias semanas a una temperatura reducida, tal como por ejemplo a 5°C; o guardarse durante
65 varios meses en un crioprotector como se expone más adelante. Preferiblemente, la atmósfera sobre las células

tiene una presión parcial de CO₂ alta como se ha expuesto arriba. Alternativamente, las células recogidas pueden utilizarse en el transcurso de varias horas, tal como por ejemplo en un proceso de fertilización, un proceso de tinción, o un proceso de clasificación.

5 **Tinción de las células**

Se utiliza un inhibidor de la motilidad para mantener las células inmóviles durante la tinción celular. Un proceso de tinción de las células espermáticas comprende típicamente la formación de una mezcla de tinción, a la que se hace referencia a veces como una mezcla de identificación, que contiene células espermáticas viables intactas, un inhibidor de la motilidad, y un tinte, al que se hace referencia a veces como un identificador. El inhibidor de la motilidad se pone en contacto con las células espermáticas para formar una suspensión de espermatozoides, y la suspensión se pone a continuación en contacto con un tinte selectivo del DNA. La fuente de esperma puede ser esperma puro, o alternativamente, un derivado de esperma que contenga espermatozoides obtenidos por centrifugación o por el uso de otros medios para separar el esperma en fracciones.

Según la presente invención, las células espermáticas se mantendrán generalmente quiescentes mientras que las mismas se mantengan en el inhibidor (Salisbury et al., 1963). Preferiblemente, sin embargo, la mezcla de tinción se mantiene en una atmósfera que tiene una presión parcial enriquecida de dióxido de carbono con relación al aire; por ejemplo, generalmente se prefiere proporcionar una atmósfera sobre la mezcla de tinción que contiene más de 99% de CO₂.

El pH de la mezcla de tinción puede mantenerse a cualquiera de una gama de valores de pH; típicamente, esta gama estará comprendida en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0. Por ejemplo, la mezcla de tinción puede mantenerse a un pH "ligeramente ácido", a saber desde aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0. En esta realización, el pH es con preferencia de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0, con más preferencia de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5, y con preferencia máxima aproximadamente 6,2. Alternativamente, la mezcla de tinción puede mantenerse a un pH "ligeramente básico", a saber, desde aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0. En esta realización, el pH es con preferencia de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0, con más preferencia desde aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5, y con preferencia máxima aproximadamente 7,3.

La mezcla de tinción puede formarse utilizando uno o más tintes selectivos de DNA excitables por UV o por luz visible, como se ha descrito anteriormente en la patente U.S. No. 5.135.759 y WO 02/41906. Tintes selectivos excitables por luz UV incluyen Hoechst 33342 y Hoechst 33258, cada uno de los cuales está disponible comercialmente de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Tintes ilustrativos excitables por luz visible incluyen SYBR-14, disponible comercialmente de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) o el conjugado bisbencimida-BODIPY® 6-{{3-((2Z)-2-{{1-(difluoroboril)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il}-metileno)-2H-pirrol-5-il}propanoil}amino)-N-[3-(metil{3-{{4-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H,3'H-2,5'-bibencimidazol-2'-il]fenoxi}acetil)amino]propil}amino)propil]hexanamida ("BBC") descrito en WO 02/41906. Cada uno de estos tintes puede utilizarse solo o en combinación; alternativamente, pueden utilizarse otros tintes penetrantes en las células excitables por luz UV y por luz visible, solos o en combinación con los tintes mencionados anteriormente, con tal que el tinte no afecte perjudicialmente a la viabilidad de las células espermáticas en un grado inaceptable cuando se utiliza en concentraciones que permiten la clasificación como se describe en otro lugar de esta memoria.

Alternativamente, la mezcla de tinción puede formarse utilizando poliamidas fluorescentes, y más específicamente poliamidas con un identificador o informador fluorescente conjugado a ellas. Tales identificadores emitirán fluorescencia cuando se unen a ácidos nucleicos. Ejemplos de poliamidas con un identificador o informador fluorescente unido a ellas incluyen, por ejemplo, las descritas en Best et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(21): 12063-12068 (2003); Gygi, et al., Nucleic Acids Res., 30(13): 2790-2799 (2002); Patente U.S. No. 5.998.140; Patente U.S. No. 6.143.901; y Patente U.S. No. 6.090.947, cuyos contenidos se incorporan por la presente en esta memoria por referencia.

Puede utilizarse también una secuencia de nucleótidos fluorescente para identificar las células espermáticas. Tales secuencias de nucleótidos emiten fluorescencia cuando se hibridan a un ácido nucleico que contiene una diana o secuencia complementaria, pero son, por el contrario, no fluorescentes cuando se encuentran en un estado no hibridado. Oligonucleótidos de este tipo se exponen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0113765 (que se incorpora por la presente en esta memoria por referencia).

Puede utilizarse también anticuerpos específicos de género para identificar las células espermáticas en una mezcla de tinción. En esta realización, por ejemplo, un anticuerpo específico de género puede conjugarse con un resto fluorescente (o molécula informadora equivalente). Dado que el anticuerpo se fija a los antígenos presentes solamente en una célula portadora del cromosoma X o, alternativamente, en una célula portadora del cromosoma Y, tales células pueden identificarse selectivamente basándose en su fluorescencia (frente a la ausencia de fluorescencia de una célula sin identificar). Además, puede utilizarse simultáneamente más de un anticuerpo con especificidad de género, teniendo cada anticuerpo un resto fluorescente diferente unido al mismo. Esto permite la

diferenciación de células portadoras del cromosoma X y portadoras del cromosoma Y, basándose en la diferente fluorescencia de cada una.

5 Pueden utilizarse también nanocristales luminiscentes selectivos de color para identificar las células espermáticas en una mezcla de tinción. Conocidas también como puntos cuánticos, estas partículas son bien conocidas en la técnica, como se demuestra por las patentes U.S. No. 6.322.901 y U.S. No. 6.576.291, cada una de las cuales se incorpora por la presente en esta memoria por referencia. Estos nanocristales se han conjugado a cierto número de materiales biológicos que incluyen por ejemplo, péptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos, estreptavidina, y polisacáridos (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. Núms. 6.207.392; 6.423.551; 5.990.479 y 6.326.144, todas las cuales se incorporan por la presente en esta memoria por referencia), y han sido utilizados para detectar dianas biológicas (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. Núms. 6.207.392 y 6.247.323, las dos cuales se incorporan por la presente en esta memoria por referencia).

15 La concentración preferida del tinte selectivo de DNA o de cualquier otro tipo de tinte en la mezcla de tinción es función de una gama de variables que incluyen la permeabilidad de las células al tinte seleccionado, la temperatura de la mezcla de tinción, la cantidad de tiempo tolerada para que se produzca la tinción, y el grado de enriquecimiento deseado en el paso de clasificación subsiguiente. En general, la concentración de tinte es preferiblemente suficiente para alcanzar el grado de tinción deseado en un periodo de tiempo razonablemente breve sin afectar en un grado sustancialmente desfavorable a la viabilidad del espermatozoide. Por ejemplo, la concentración de Hoechst 33342, Hoechst 33258, SYBR-14, o BBC en la mezcla de tinción estará comprendida por regla general entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1,0 M, con preferencia desde aproximadamente 1,0 μM a aproximadamente 700 μM , y con preferencia máxima desde aproximadamente 100 μM a aproximadamente 200 μM . En una realización particularmente preferida, la concentración de Hoechst 33342, Hoechst 33258, SYBR-14, o BBC en la mezcla de tinción estará comprendida por regla general entre aproximadamente 400 μM y aproximadamente 500 μM , y será con preferencia máxima aproximadamente 450 μM . Según lo anterior, en una serie de condiciones de tinción, la concentración de Hoechst 33342 es con preferencia aproximadamente 10 μM . En otra serie de condiciones de tinción, la concentración de Hoechst 33342 es aproximadamente 150 μM . En otra serie adicional de condiciones de tinción, la concentración es con preferencia aproximadamente 200 μM . En otra serie adicional de condiciones de tinción, la concentración de Hoechst 33342 es con preferencia máxima aproximadamente 450 μM .

30 Como otro ejemplo, la concentración de una poliamida fluorescente, tal como por ejemplo las descritas en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2001/0002314, estará comprendida por regla general entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 1 mM, con preferencia desde aproximadamente 1 μM a aproximadamente 1 mM, con más preferencia aproximadamente 5 μM a aproximadamente 100 mM, y con más preferencia aún aproximadamente 10 μM .

35 Opcionalmente, la mezcla de tinción puede contener también aditivos para mejorar la viabilidad del espermatozoide. Aditivos ilustrativos incluyen un antibiótico, un factor de crecimiento o una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción intracelular y/o extracelularmente como se ha expuesto con anterioridad con respecto a la recogida de la muestra de células. Estos aditivos pueden añadirse al fluido de recogida según lo anterior.

40 Una vez formada, la mezcla de tinción se utiliza a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 30°C para tinción de las células espermáticas; con preferencia, la temperatura es desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, con más preferencia desde aproximadamente 25°C a aproximadamente 30°C, y con preferencia máxima aproximadamente 28°C. La selección de una temperatura preferida depende generalmente de una serie de variables, que incluyen por ejemplo la permeabilidad de las células al tinte o tintes que se utilicen, la concentración del o de los tintes en la mezcla de tinción, la cantidad de tiempo que permanecerán las células en la mezcla de tinción, y el grado de enriquecimiento deseado en el paso de clasificación.

50 Se deja que la absorción del tinte por las células espermáticas en la mezcla de tinción continúe durante un periodo de tiempo suficiente para obtener el grado deseado de tinción del DNA. Dicho periodo es típicamente un periodo suficiente para que el tinte se fije al DNA de las células espermáticas a fin de que las células espermáticas portadoras del cromosoma X e Y puedan clasificarse basándose en la intensidad de fluorescencia diferente y mensurable entre las dos. Según la presente invención, dicho periodo no será mayor que aproximadamente 160 minutos, con preferencia no mayor que aproximadamente 90 minutos, con más preferencia todavía no mayor que aproximadamente 60 minutos, y con preferencia máxima estará comprendido entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 40 minutos.

60 En una realización de la presente invención, se forma una mezcla de tinción que comprende células espermáticas, un inhibidor de la motilidad, y un tinte en una concentración comprendida entre aproximadamente 100 μM y aproximadamente 200 μM , y la mezcla de tinción se mantiene durante un periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 28°C. En otra realización, el inhibidor de la motilidad comprende 0,204 g de NaHCO_3 , 0,433 g de KHCO_3 , y 0,473 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 25 ml de agua purificada (0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 , 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua).

65

En otra realización adicional, se forma una mixtura de tinción que comprende células espermáticas, un inhibidor de la motilidad, y un tinte en una concentración de aproximadamente 400 μM a aproximadamente 500 μM , y la mixtura de tinción se mantiene durante un periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 28°C. En otra realización, la concentración de tinte es 450 μM . En otra realización, el inhibidor de la motilidad comprende 0,204 g de NaHCO_3 , 0,433 g de KHCO_3 , y 0,473 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 25 ml de agua purificada (0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 , 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua).

Clasificación

10 Puede utilizarse también un inhibidor de la motilidad para hacer que las células espermáticas se mantengan inmóviles durante la clasificación de las células espermáticas. Generalmente, una vez que los espermatozoides se tiñen según la presente invención, los mismos pueden clasificarse según cualquier medio conocido que permita separación basada en fluorescencia. Métodos utilizados comúnmente y bien conocidos incluyen sistemas de citometría de flujo, como se ilustra y se describe en las Patentes U.S. Núms. 5.135.759, 5.985.216, 6.071.689, 15 6.149.867, y 6.263.745, las Publicaciones de Patente Internacional WO 99/33956 y WO 01/37655, y la Solicitud de Patente U.S. No. de Serie 10/812.351, cuyo contenido se incorpora por la presente en esta memoria por referencia, y la Publicación de Patente Internacional correspondiente WO 2004/088283. Cuando se clasifica según dichos métodos, los espermatozoides se introducen en la tobera de un citómetro de flujo en un fluido muestra. En una 20 realización, por consiguiente, el fluido muestra puede comprender las células espermáticas teñidas y un inhibidor de la motilidad.

Análogamente, el fluido envolvente utilizado para rodear la corriente de fluido muestra a medida que la misma se desplaza a lo largo del citómetro puede comprender también un inhibidor de la motilidad. Generalmente, el fluido envolvente puede introducirse en una tobera del citómetro utilizando gas presurizado o por medio de una bomba de 25 jeringuilla. Preferiblemente, el gas presurizado es dióxido de carbono o nitrógeno, con más preferencia nitrógeno. Alternativamente, el gas presurizado puede ser dióxido de carbono, aunque en tales circunstancias, debería tenerse precaución para minimizar la efervescencia.

Opcionalmente, el fluido muestra o fluido envolvente puede contener también aditivos, tales como un antibiótico, una 30 composición que regule las reacciones de oxidación/reducción intracelular o extracelularmente, o un factor de crecimiento como se ha expuesto anteriormente con respecto a la recogida de la muestra de células. Cada uno de estos aditivos puede añadirse a cualquiera de los fluidos según lo anterior.

Recogida de las células clasificadas

35 Una vez que se han clasificado, las células clasificadas se recogen en una vasija que contiene un fluido de recogida. Generalmente, el propósito del fluido de recogida incluye amortiguar el impacto de las células espermáticas con la vasija de recogida o proporcionar un soporte fluido para las células.

40 En una realización, el fluido de recogida comprende un inhibidor de la motilidad y una fuente de proteína. Si se incluye, la fuente de proteína puede ser cualquier fuente de proteína que no interfiera con la viabilidad de las células espermáticas y sea compatible con el inhibidor de la motilidad. Ejemplos de fuentes comunes de proteína incluyen leche (con inclusión de leche homogeneizada térmicamente y desnatada), extracto de leche, yema de huevo, 45 extracto de yema de huevo, proteína de soja y extracto de proteína de soja. Tales proteínas pueden utilizarse en una concentración que va desde aproximadamente 1% (v/v) a aproximadamente 30% (v/v) con preferencia desde aproximadamente 10% (v/v) a aproximadamente 20% (v/v), y con más preferencia aproximadamente 10% (v/v).

Opcionalmente, el fluido de recogida puede contener también aditivos tales como un antibiótico, un factor de 50 crecimiento o una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción intracelular o extracelularmente, como se ha expuesto con anterioridad con respecto a la recogida de la muestra de células. Cada uno de estos aditivos puede añadirse al fluido de recogida conforme a lo anterior.

De acuerdo con ello, en cierta realización, el fluido de recogida comprende 0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 , 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 10% (v/v) de yema de huevo en agua, a un pH de aproximadamente 6,2, 55 con más preferencia aproximadamente 7,0, y con más preferencia todavía aproximadamente 6,5. Preferiblemente, el fluido de recogida se mantiene en una atmósfera que tenga una presión parcial enriquecida en dióxido de carbono con relación al aire; por ejemplo, la atmósfera puede tener una presión parcial de dióxido de carbono que excede de 0,9, con más preferencia 0,95 y con más preferencia todavía 0,99.

60 En lugar del uso de un fluido de recogida más tradicional, las células clasificadas pueden recogerse en una vasija que contenga o esté recubierta con un crioprotector. De acuerdo con ello, en una realización particular, las células clasificadas se recogen en un crioprotector que comprende un inhibidor de la motilidad. En otra realización, las células clasificadas se recogen en un crioprotector que comprende un inhibidor de la motilidad, agua, Triladyl® (Minitube, Verona, WI, que comprende glicerol, tris, ácido cítrico, fructosa, 5 mg/100 ml de tilosina, 25 mg/100 ml de 65 gentamicina, 3,0 mg/100 ml de espectinomina, y 15 mg/100 ml de lincomicina), yema de huevo, y ácido pirúvico.

En otra realización adicional, el fluido de recogida es el criotendedor que comprende 0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 , 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua, y 25 g de Triladyl®, 25 g de yema de huevo, y 10 mM de ácido pirúvico por 75 ml de agua.

5 **Criotensión de las células clasificadas**

Una vez que las células espermáticas se han clasificado y recogido en vasijas de recogida, pueden utilizarse las mismas para inseminación de mamíferos hembra. Esto puede ocurrir casi inmediatamente, requiriendo poco tratamiento adicional del esperma. Análogamente, el esperma puede enfriarse o congelarse también para uso en una fecha posterior. En tales casos, el esperma puede beneficiarse de la adición de un criotendedor a fin de minimizar el impacto sobre la viabilidad o la motilidad posterior a la descongelación como resultado del enfriamiento y la congelación.

Puede utilizarse un inhibidor de la motilidad para mantener inmóviles las células en el criotendedor. Generalmente, un criotendedor puede comprender un inhibidor de la motilidad, una fuente de proteína, y un crioprotector. Si se incluye, puede añadirse una fuente de proteína para proporcionar soporte a las células y amortiguar el contacto de las células con la vasija de recogida. La fuente de proteína puede ser cualquier fuente de proteína que no interfiera con la viabilidad de las células espermáticas y sea compatible con el inhibidor de la motilidad. Ejemplos de fuentes de proteína comunes incluyen leche (con inclusión de leche homogeneizada térmicamente y desnatada), extracto de leche, yema de huevo, extracto de yema de huevo, proteína de soja y extracto de proteína de soja. Tales proteínas pueden encontrarse en una concentración que va desde aproximadamente 10% (v/v) a aproximadamente 30% (v/v), con preferencia desde aproximadamente 10% (v/v) a aproximadamente 20% (v/v), y con más preferencia aproximadamente 20% (v/v).

Preferiblemente se incluye un crioprotector en el criotendedor a fin de aminorar o prevenir el choque frío o para mantener la fertilidad de los espermatozoides. Se conocen en la técnica numerosos crioprotectores. La selección de un crioprotector adecuado para uso con un extendedor dado puede variar, y depende de la especie de la que se haya obtenido el esperma a congelar. Ejemplos de crioprotectores adecuados incluyen, por ejemplo, glicerol, dimetil-sulfóxido, etilenglicol, propilenglicol, trehalosa, Triladyl®, y combinaciones de los mismos. Si se incluyen, generalmente, estos crioprotectores están presentes en el criotendedor en una cantidad de aproximadamente 1% (v/v) a aproximadamente 15% (v/v), con preferencia en una cantidad de aproximadamente 5% (v/v) a aproximadamente 10% (v/v), con más preferencia en una cantidad que va desde aproximadamente 7% (v/v), y con preferencia máxima en una cantidad de aproximadamente 6% (v/v).

En una realización particular, el criotendedor comprende un inhibidor de la motilidad, agua, Triladyl®, yema de huevo, y ácido pirúvico. En otra realización adicional, el criotendedor comprende 0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 , 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua, y 25 g de Triladyl®, 25 g de yema de huevo, y 10 mM de ácido pirúvico por 75 ml de agua.

En otra realización particular, el criotendedor comprende un inhibidor de la motilidad, agua, Triladyl®, y yema de huevo. En otra realización adicional⁴⁹, el criotendedor comprende 0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 , 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua, y 25 g de Triladyl®, y 25 g de yema de huevo por 75 ml de agua.

Opcionalmente, el criotendedor puede contener también un antibiótico, un factor de crecimiento o una composición que regule las reacciones de oxidación/reducción intracelular y/o extracelularmente como se ha expuesto con anterioridad con respecto a la recogida de la muestra de células. Cada uno de estos aditivos puede añadirse al fluido de recogida según lo anterior.

EJEMPLOS

Los ejemplos no limitantes que siguen se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención.

Ejemplo 1

Se recogió semen de un toro sexualmente maduro utilizando una vagina artificial y se transportó a 25°C en un recipiente de temperatura controlada a la instalación de tinción. A su recepción, se analizó el semen respecto a concentración, motilidad y motilidad progresiva por el Analizador de Motilidad Hamilton-Thorn (IVOS), según procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9 (marzo 1998)). Basándose en la concentración del semen, se prepararon varios tubos de suspensiones de 150×10^6 espermatozoides/ml por suspensión del semen en un tampón de TCA o un inhibidor basado en carbonato. La Tabla I siguiente ilustra las composiciones y condiciones de tinción utilizadas.

Tabla I.

Nombre de la Muestra	Composición	pH	Conc. (μM) Hoechst	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
10mM pir TCA	10mM piruvato en TCA	7,3	600 μM	28 $^{\circ}\text{C}$
10mM pir CO ₂	10mM piruvato en TCA; atmósfera protectora inerte con balón de CO ₂	7,3	600 μM	28 $^{\circ}\text{C}$
Carbonato 6,2	Inhibidor basado en carbonato, pH 6,2	6,2	600 μM	28 $^{\circ}\text{C}$
Carbonato 7,3	Inhibidor basado en carbonato, pH 7,3	7,3	600 μM	28 $^{\circ}\text{C}$

5 A las suspensiones de espermatozoides se añadieron partes alícuotas de una solución 10 mM de Hoechst en agua, a fin de obtener una concentración de Hoechst 600 μM . Las suspensiones de espermatozoides se mantuvieron en un baño de agua a 28 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la duración del periodo de tinción (aproximadamente 1 hora). Las suspensiones de espermatozoides se analizaron por retirada de una parte alícuota de 50 μl de la suspensión de espermatozoides teñida, adición de 200 μl de piruvato 10 mM a 25 $^{\circ}\text{C}$ en TCA a pH 7,3 para iniciar la inversión de la quiescencia, dejando al menos un periodo de equilibración de 5 minutos, y analizando por IVOS para medir la motilidad progresiva porcentual (% Prog. Mot.). Las comparaciones de las motilidades progresivas porcentuales IVOS se ven en las Figuras 1-3.

Ejemplo 2

15 Se recogió semen de toro de un toro sexualmente maduro utilizando una vagina artificial y se transportó a 25 $^{\circ}\text{C}$ en un recipiente de temperatura controlada a la instalación de tinción. A su recepción, el semen se analizó respecto a concentración, motilidad y motilidad progresiva por el Analizador de Motilidad Hamilton-Thorn (IVOS), según procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9 (marzo 1998)). Basándose en la concentración del semen, se prepararon varios tubos de suspensiones de 450x10⁶ espermatozoides/ml por suspensión del semen en un tampón de TCA o un inhibidor basado en carbonato. La Tabla II siguiente ilustra las composiciones y condiciones de tinción utilizadas.

Tabla II

Nombre de la Muestra	Composición	pH	Conc. (μM) Hoechst	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
10mM pir TCA	10mM piruvato en TCA	7,3	1000 μM	28 $^{\circ}\text{C}$
Carbonato 6,2	Inhibidor basado en carbonato, pH 6,2	6,2	1000 μM	28 $^{\circ}\text{C}$
Carbonato 7,3	Inhibidor basado en carbonato, pH 7,3	7,3	1000 μM	28 $^{\circ}\text{C}$

25 Se añadieron a las suspensiones de espermatozoides partes alícuotas de una solución de Hoechst 10 mM a fin de obtener una concentración de Hoechst 1000 μM . Las suspensiones de espermatozoides se mantuvieron en un baño de agua a 28 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, y se diluyeron luego a 150x10⁶ espermatozoides/ml con piruvato 10 mM en TCA o un inhibidor basado en carbonato a un pH de 6,2 como se indica específicamente en cada figura para diluir hasta una concentración típica para la clasificación. Las suspensiones de espermatozoides se analizaron por retirada de una parte alícuota de 50 μl de la suspensión de espermatozoides teñida y diluida en el periodo de tiempo designado en cada figura y adición de 200 μl de piruvato 10 mM a 25 $^{\circ}\text{C}$ en TCA a pH 7,3 para iniciar la inversión de la quiescencia, dejando al menos un periodo de equilibración de 5 minutos, y analizando la parte alícuota por IVOS para medir la motilidad progresiva porcentual. Las comparaciones de las motilidades progresivas porcentuales IVOS se ven en las Figuras 4-6.

Ejemplo 3

40 Se aisló semen de toro de un toro sexualmente maduro utilizando una vagina artificial y se transportó a 25 $^{\circ}\text{C}$ en un recipiente de temperatura controlada a la instalación de tinción. A su recepción, el semen se analizó respecto a concentración, motilidad y motilidad progresiva por el Analizador de Motilidad Hamilton-Thorn (IVOS), según procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9 (marzo 1998)). Basándose en la concentración del semen, se prepararon varios tubos de 450x10⁶ espermatozoides/ml por suspensión del semen en un tampón de TCA o un inhibidor basado en carbonato. La Tabla II siguiente ilustra las composiciones y condiciones de tinción utilizadas.

Tabla III

Nombre de la Muestra	Tampón	pH	Conc. (μM) Hoechst	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
10mM pir TCA	10mM piruvato en TCA	7,3	300 μM	41 $^{\circ}\text{C}$
Carbonato 6,2	Inhibidor basado en carbonato, pH 6,2	6,2	300 μM	41 $^{\circ}\text{C}$
Carbonato 7,3	Inhibidor basado en carbonato, pH 7,3	7,3	300 μM	41 $^{\circ}\text{C}$

5 A las suspensiones de espermatozoides, se añadieron partes alícuotas de una solución de Hoechst 10 mM en agua para dar una concentración de Hoechst 300 μM . Las suspensiones de espermatozoides se mantuvieron en un baño de agua a 41 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, y se diluyeron luego a 150x10⁶ espermatozoides/ml con piruvato 10 mM en TCA o un inhibidor basado en carbonato a pH de 6,2 como se indica específicamente en cada figura para diluir hasta una concentración típica para la clasificación. Las suspensiones de espermatozoides se analizaron por retirada de una parte alícuota de 50 μl de la suspensión de espermatozoides teñida y diluida en el periodo de tiempo designado en cada figura y adición de 200 μl de piruvato 10 mM en TCA a 25 $^{\circ}\text{C}$ y a pH 7,3 para iniciar la inversión de la quiescencia, dejando al menos un periodo de equilibración de 5 minutos, y analizando por IVOS para medir la motilidad progresiva porcentual. Las comparaciones de las motilidades progresivas porcentuales IVOS se ven en las Figuras 7-9.

15 Ejemplo 4

Se recogió semen de toro de un toro sexualmente maduro utilizando una vagina artificial y la muestra se diluyó en 2 partes de tampón de carbonato para transporte a 25 $^{\circ}\text{C}$ en un recipiente de temperatura controlada a la instalación de tinción. A su recepción, el semen se analizó respecto a concentración, motilidad, y motilidad progresiva por el 20 Analizador de Motilidad Hamilton-Thorn (IVOS), según procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9 (marzo 1998)). Basándose en la concentración del semen, se preparó 1 ml de suspensión de 150x10⁶ espermatozoides/ml por retirada de una parte alícuota de la suspensión de espermatozoides en carbonato, centrifugación de la suspensión de espermatozoides a 500xg durante 5 minutos, retirada del sobrenadante y re-suspensión del sedimento en tampón de TCA a 41 $^{\circ}\text{C}$ y pH 7,3. Se preparó 1 ml adicional de 25 150x10⁶ espermatozoides/ml por suspensión de una parte alícuota de semen en tampón de TCA a 41 $^{\circ}\text{C}$ que contenía piruvato 10 mM a pH 7,3. Se añadieron a las suspensiones de espermatozoides partes alícuotas de solución de Hoechst 10 mM en agua para obtener la concentración de tinte Hoechst 400 μM . Las suspensiones de espermatozoides se mantuvieron en un baño de agua a 41 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la duración del periodo de tinción. Las suspensiones de espermatozoides se analizaron por retirada de una parte alícuota de 50 μl de la suspensión de 30 células espermáticas de tinción, adición de 200 μl del mismo tampón a la misma temperatura y análisis por IVOS para medir la motilidad progresiva % (% Prog. Mot.). Los resultados del análisis IVOS se resumen en la Figura 10.

Ejemplo 5

35 Se obtuvieron y se prepararon muestras de esperma de la misma manera que en el Ejemplo 4 con la excepción siguiente. Los tampones utilizados para suspender los espermatozoides para tinción y análisis IVOS eran TCA y TCA que contenía vitamina K 10 μM . Los resultados del análisis IVOS se resumen en la Figura 11.

40 Ejemplo 6

Se obtuvieron y se prepararon muestras de esperma de la misma manera que en el Ejemplo 4 con la excepción siguiente. Los tampones utilizados para suspender los espermatozoides para tinción y análisis IVOS eran TCA y TCA que contenía vitamina K 100 μM . Los resultados del análisis IVOS se resumen en la Figura 12.

45 Ejemplo 7

Se obtuvieron y se prepararon muestras de esperma de la misma manera que en el Ejemplo 4 con la excepción siguiente. Los tampones utilizados para suspender los espermatozoides para tinción y análisis IVOS eran TCA y TCA que contenía ácido lipoico 1 mM. Los resultados del análisis IVOS se resumen en la Figura 13.

50 Ejemplo 8

Se recogió semen de toro de un toro sexualmente maduro utilizando una vagina artificial y la muestra se diluyó en 2 partes de tampón de carbonato para transporte a 25 $^{\circ}\text{C}$ en un recipiente de temperatura controlada a la instalación de tinción. A su recepción, el semen se analizó respecto a concentración, motilidad, y motilidad progresiva por el 55 Analizador de Motilidad Hamilton-Thorn (IVOS), según procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9 (marzo 1998)). Basándose en la concentración del semen, se preparó 1 ml de suspensión de 150x10⁶ espermatozoides/ml por centrifugación de la suspensión de espermatozoides a 500xg durante 5 minutos, retirada del sobrenadante y re-suspensión del sedimento en tampón de TCA a 28 $^{\circ}\text{C}$ y pH 7,3. Se

preparó 1 ml adicional de 150×10^6 espermatozoides/ml por suspensión de una parte alícuota de semen en tampón de TCA a 28°C que contenía piruvato 10 mM a pH 7,3. Se añadieron a las suspensiones de espermatozoides partes alícuotas de una solución de Hoechst 10 mM en agua a fin de obtener la concentración de tinte Hoechst 600 μ M. Las suspensiones de espermatozoides se mantuvieron en un baño de agua a 28°C durante toda la duración del periodo de tinción. Las suspensiones de espermatozoides se analizaron por retirada de una parte alícuota de 50 μ l de la suspensión de células espermáticas de tinción, adición de 200 μ l del mismo tampón a la misma temperatura y análisis por IVOS para medir la motilidad progresiva porcentual (% Prog. Mot.). Los resultados del análisis IVOS se resumen en la Figura 14.

10 Ejemplo 9

Se obtuvieron muestras de esperma y se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 8 con la excepción siguiente. Los tampones utilizados para suspender los espermatozoides para tinción y análisis IVOS eran TCA y TCA que contenía vitamina K 100 μ M. Los resultados del análisis IVOS se resumen en la Figura 15.

15 Ejemplo 10

Se obtuvieron y se prepararon muestras de esperma de la misma manera que en el Ejemplo 8 con la excepción siguiente. Los tampones utilizados para suspender los espermatozoides para tinción y análisis IVOS eran TCA y TCA que contenía ácido lipoico 1 mM. Los resultados del análisis IVOS se resumen en la Figura 16.

Ejemplo 11

Se recogió semen de toro procedente de un toro sexualmente maduro utilizando una vagina artificial y se diluyó la muestra en 2 partes de tampón de carbonato para su transporte a 25°C en un recipiente de temperatura controlada a la instalación de tinción. A su recepción, el semen se analizó en cuanto a concentración, motilidad, y motilidad progresiva por el Analizador de Motilidad Hamilton-Thorn (IVOS), según procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9 (marzo 1998)). Basándose en la concentración del semen, se prepararon suspensiones de 1 ml de 150×10^6 espermatozoides/ml por retirada de partes alícuotas de la suspensión de espermatozoides en carbonato, centrifugación de la suspensión de espermatozoides a 500xg durante 5 minutos, retirada del sobrenadante y re-suspensión del sedimento en 1 ml de tampón de TCA o en 1 ml de tampón de TCA con piruvato 2,5 mM, 10 mM, 25 mM, o 50 mM. Se añadió a las muestras solución MON 33342 para obtener las concentraciones finales de tinte de 600 μ M. Las suspensiones se incubaron en un baño de agua a 28°C. Las suspensiones de espermatozoides teñidas se analizaron por retirada de una parte alícuota de 50 μ l de la suspensión de espermatozoides de tinción, adición de 200 μ l del mismo tampón a la misma temperatura y análisis por IVOS a fin de medir la motilidad progresiva porcentual (% Prog. Mot.). Los resultados IVOS para % Prog. Mot. se resumen en la Figura 17.

40 Ejemplo 12

Se recogió semen de toro de un toro sexualmente maduro utilizando una vagina artificial y la muestra se diluyó en 2 partes de tampón de carbonato para transporte a 25°C en un recipiente de temperatura controlada a la instalación de tinción. A su recepción, el semen se analizó respecto a concentración, motilidad, y motilidad progresiva por el Analizador de Motilidad Hamilton-Thorn (IVOS), según procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9 (marzo 1998)). Basándose en la concentración de semen, se preparó 1 ml de suspensión de 150×10^6 espermatozoides/ml en tampón de TCA por retirada de una parte alícuota de la suspensión de espermatozoides en carbonato, centrifugación de la suspensión de espermatozoides a 500xg durante 5 minutos, retirada del sobrenadante y re-suspensión del sedimento en 1 ml tampón de TCA. Se preparó 1 ml de suspensión de 150×10^6 espermatozoides/ml en piruvato 10 mM en TCA por retirada de una parte alícuota de la suspensión de espermatozoides en carbonato, centrifugación de la suspensión de espermatozoides a 500xg durante 5 minutos, retirada del sobrenadante y re-suspensión del sedimento en 1 ml de tampón piruvato-TCA 10 mM. Se añadió a las muestras solución de tinte SYBR 14 para obtener las concentraciones finales de tinte 20 μ M. Las suspensiones se incubaron en un baño de agua a 28°C. Se analizaron las suspensiones de espermatozoides por retirada de una parte alícuota de 50 μ l de la suspensión de espermatozoides de tinción, adición de 200 μ l del mismo tampón a la misma temperatura y análisis por IVOS para medir la motilidad progresiva porcentual (% Prog. Mot.). Los resultados IVOS para % Prog. Mot. se muestran en la Figura 18.

Ejemplo 13

Se recogió semen de toro de un toro sexualmente maduro utilizando una vagina artificial y se diluyó la muestra en 2 partes de tampón de carbonato para transporte a 25°C en un recipiente de temperatura controlada a la instalación de tinción. A su recepción, se analizó el semen respecto a concentración, motilidad, y motilidad progresiva por el Analizador de Motilidad Hamilton-Thorn (IVOS), según procedimientos estándar y bien conocidos (Farrell et al. Theriogenology, 49(4): 871-9 (marzo 1998)). Basándose en la concentración de semen, se preparó 1 ml de suspensión de 150×10^6 espermatozoides/ml en tampón de TCA por retirada de una parte alícuota de la suspensión

de espermatozoides en carbonato, centrifugación de la suspensión de espermatozoides a 500xg durante 5 minutos, retirada del sobrenadante y re-suspensión del sedimento en 1 ml de tampón de TCA. Se preparó 1 ml de suspensión de 150×10^6 espermatozoides/ml en piruvato 10 mM en TCA, por retirada de una parte alícuota de la suspensión de espermatozoides en carbonato, centrifugación de la suspensión de espermatozoides a 500xg durante 5 minutos, retirada del sobrenadante y re-suspensión del sedimento en 1 ml de de tampón piruvato-TCA 10 mM. Se añadió a las muestras solución de BBC para obtener las concentraciones finales de tinte de 100 μ M. Las suspensiones se incubaron en un baño de agua a 28°C. Las suspensiones de espermatozoides teñidas se analizaron por retirada de una parte alícuota de 50 μ l de la suspensión de espermatozoides de tinción, adición de 200 μ l del mismo tampón a la misma temperatura y análisis por IVOS para medir la motilidad progresiva porcentual (% Prog. Mot.). Los resultados IVOS para % Prog. Mot. se muestran en la Figura 19.

Ejemplo 14

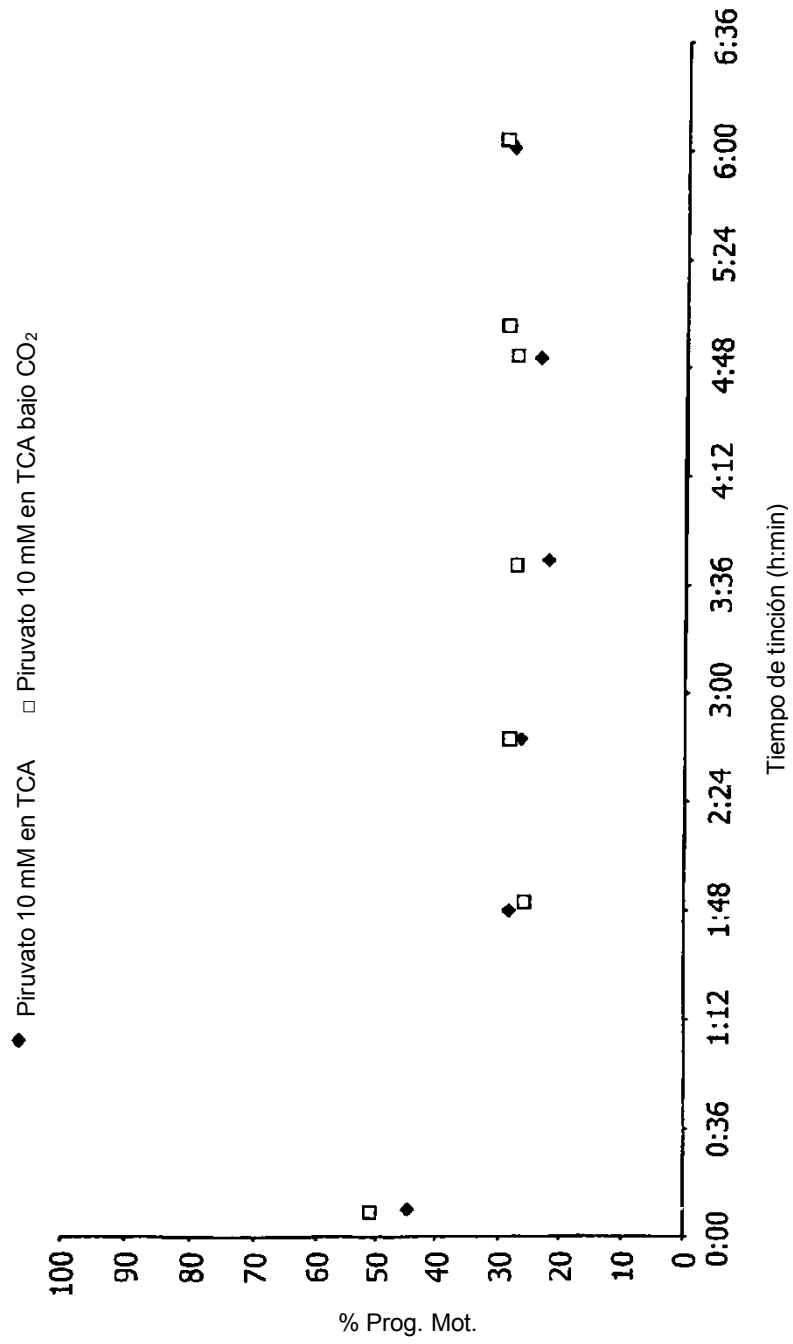
Se obtuvieron muestras de esperma y se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 4 con la excepción siguiente. La concentración de tinción fue BBC 200 μ M. Los resultados del análisis IVOS se resumen en la Figura 20.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género que comprende:
- 5 (a) mezclar una suspensión de células espermáticas no humano con una composición que inhibe la motilidad de las células espermáticas no humano y comprende una ratio molar de potasio a sodio mayor que 1:1, respectivamente, y a continuación con una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción intracelular y/o extracelularmente seleccionada del grupo constituido por piruvato, vitamina K, ácido lipoico, glutatión, flavinas, quinonas, superóxido-dismutasa (SOD) y miméticos de SOD;
- 10 (b) teñir la suspensión de células espermáticas no humanas inmóviles con un tinte selectivo del DNA durante menos de 160 minutos y a una temperatura de 4°C a 30°C; y
- (c) clasificar la suspensión de células espermáticas no humanas inmóviles teñidas para formar una población de inseminación viable enriquecida en género de células espermáticas no humanas portadoras del cromosoma X o portadoras del cromosoma Y que tienen tinte seleccionado de DNA asociado con su DNA; y
- 15 (d) retornar dichas células espermáticas no humanas a un estado activado, en donde al menos 20% de las células reactivadas tienen una velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas, que es al menos 50% de la velocidad de paso, la velocidad progresiva, o ambas de las células espermáticas del eyaculado reciente como se mide por análisis de esperma HTM-IVOS.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde la ratio molar de potasio a sodio es mayor que 1,5:1, respectivamente.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la ratio molar de potasio a sodio es mayor que 1,75:1, respectivamente.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en donde la ratio molar de potasio a sodio es mayor que 2:1, respectivamente.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde el tinte se selecciona del grupo constituido por Hoechst 33342, Hoechst 33258, SYBR-14, y el conjugado bisbencimida-BODIPY® 6-{{3-((2Z)-2-{{1-(difluoroboril)-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il]-metileno}-2H-pirrol-5-il)propanoil]amino}-N-[3-(metil{3-{{4-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H,3H-2,5'-bibencimidazol-2'-il]fenoxi}acetil)amino]propil}-amino)propil]hexanamida.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género comprende una fuente de carbonato.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género comprende NaHCO_3 , KHCO_3 , y $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- 40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género se forma a partir de un tampón que comprende 0,097 moles/l de NaHCO_3 , 0,173 moles/l de KHCO_3 y 0,090 moles/l de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la concentración de espermatozoides en la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género es al menos $1,25 \times 10^8$ espermatozoides por ml.
- 45 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la concentración de espermatozoides en la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género es al menos $1,5 \times 10^8$ espermatozoides por ml.
- 50 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la concentración de espermatozoides en la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género es al menos $1,75 \times 10^8$ espermatozoides por ml.
- 55 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la concentración de espermatozoides en la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género es menor que $9,0 \times 10^5$ espermatozoides por ml.
- 60 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la concentración de espermatozoides en la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género es menor que 7×10^5 espermatozoides por ml.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la concentración de espermatozoides en la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género es menor que aproximadamente 5×10^5 espermatozoides por ml.
- 5 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la concentración de espermatozoides en la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género es menor que 2×10^5 espermatozoides por ml.
- 10 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la concentración de espermatozoides en la suspensión de células espermáticas no humanas enriquecidas en género es menor que 1×10^5 espermatozoides por ml.
- 15 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde la suspensión de células espermáticas se encuentra en una atmósfera que tiene una presión parcial enriquecida en CO_2 con relación al aire.

FIG. 1



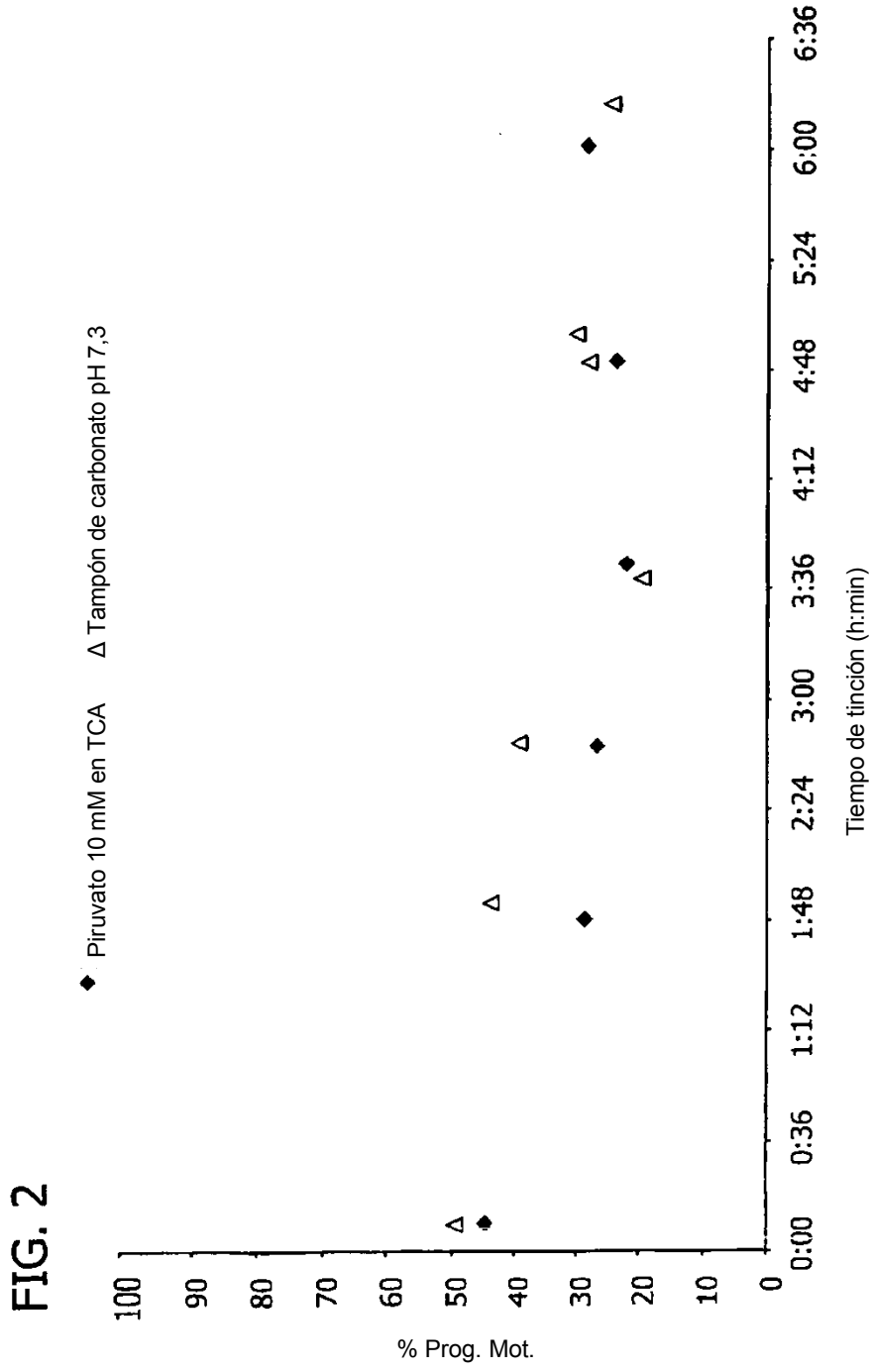


FIG. 3

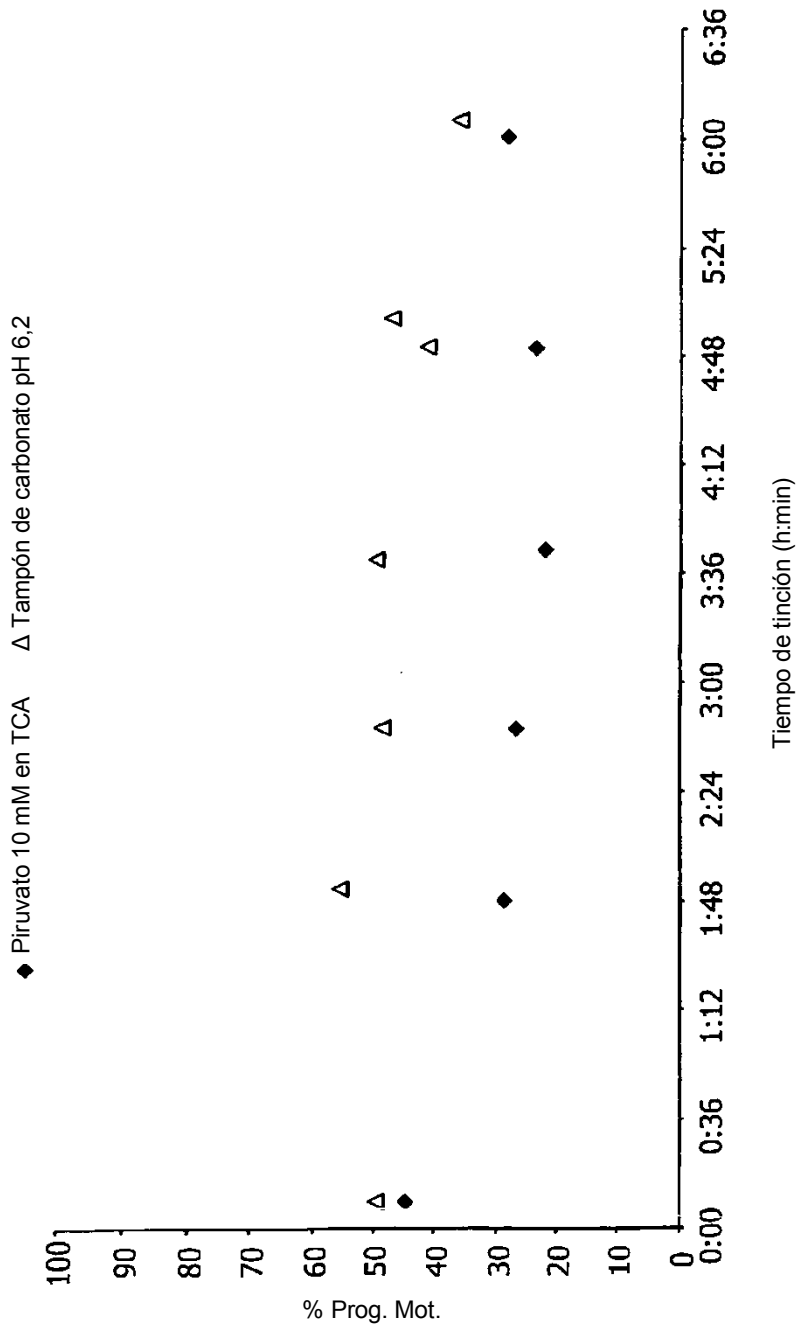


FIG. 4

◆ Piruvato 10 mM en tampón de TCA □ Piruvato 10 mM en TCA durante 1 hora y adición de 2 volúmenes de tampón de carbonato pH 6,2

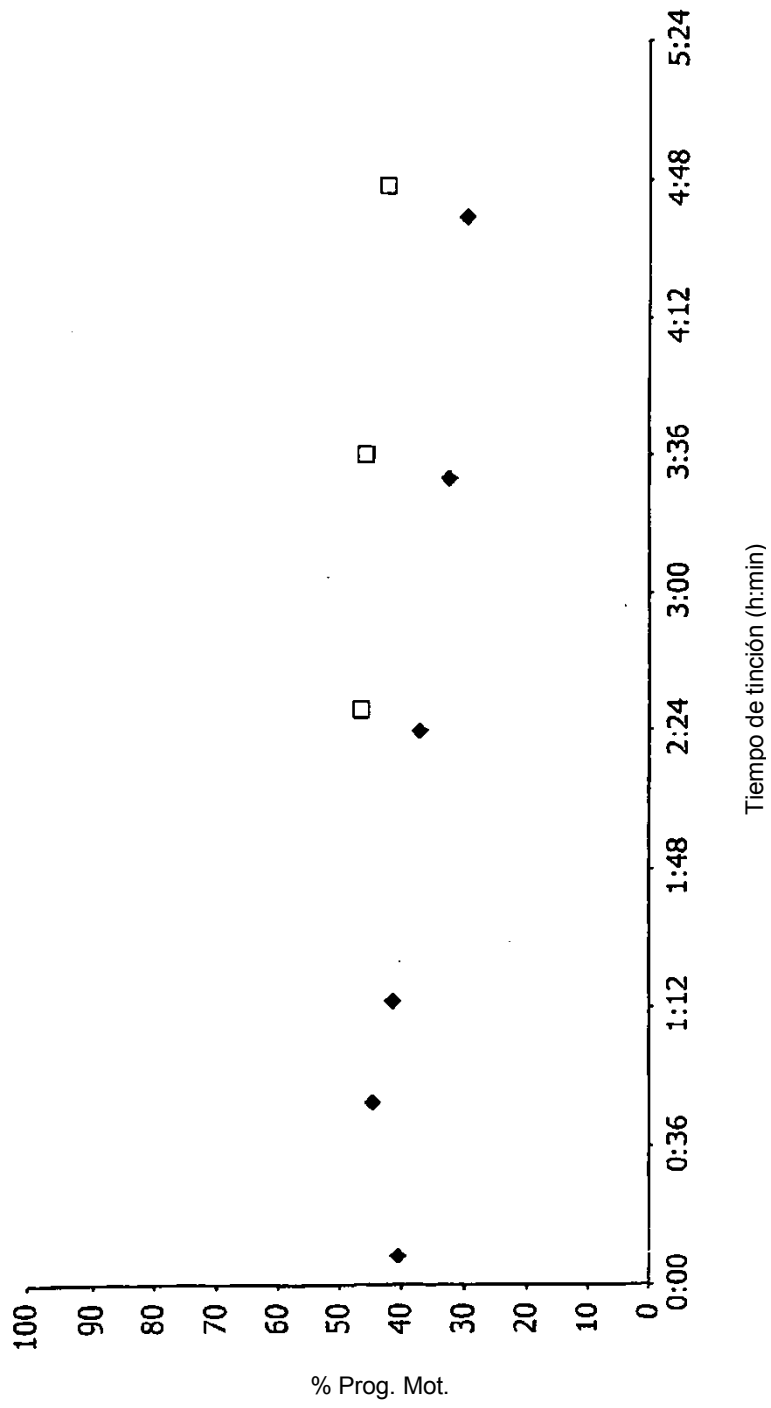


FIG. 5

Piruvato 10 mM en tampón de TCA ◇ Tampón de carbonato de pH 7,3 1 h – Adición de 2 volúmenes de tampón de carbonato de pH 6,2

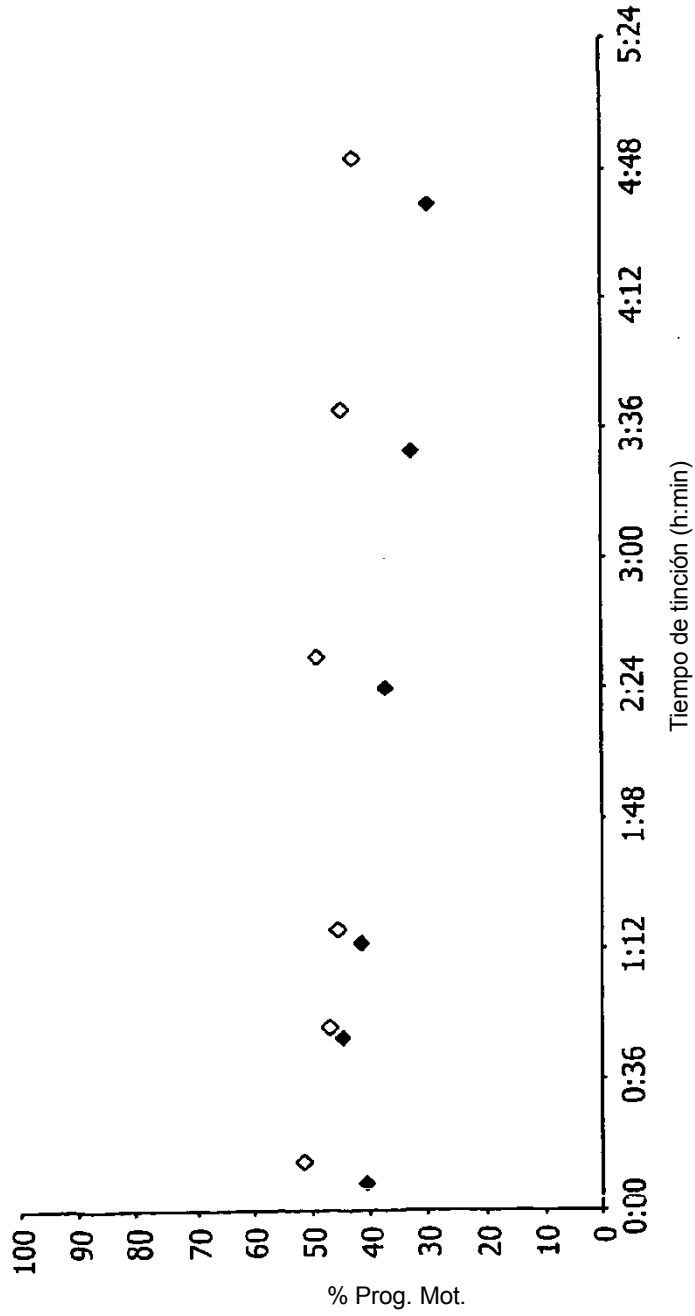


FIG. 6

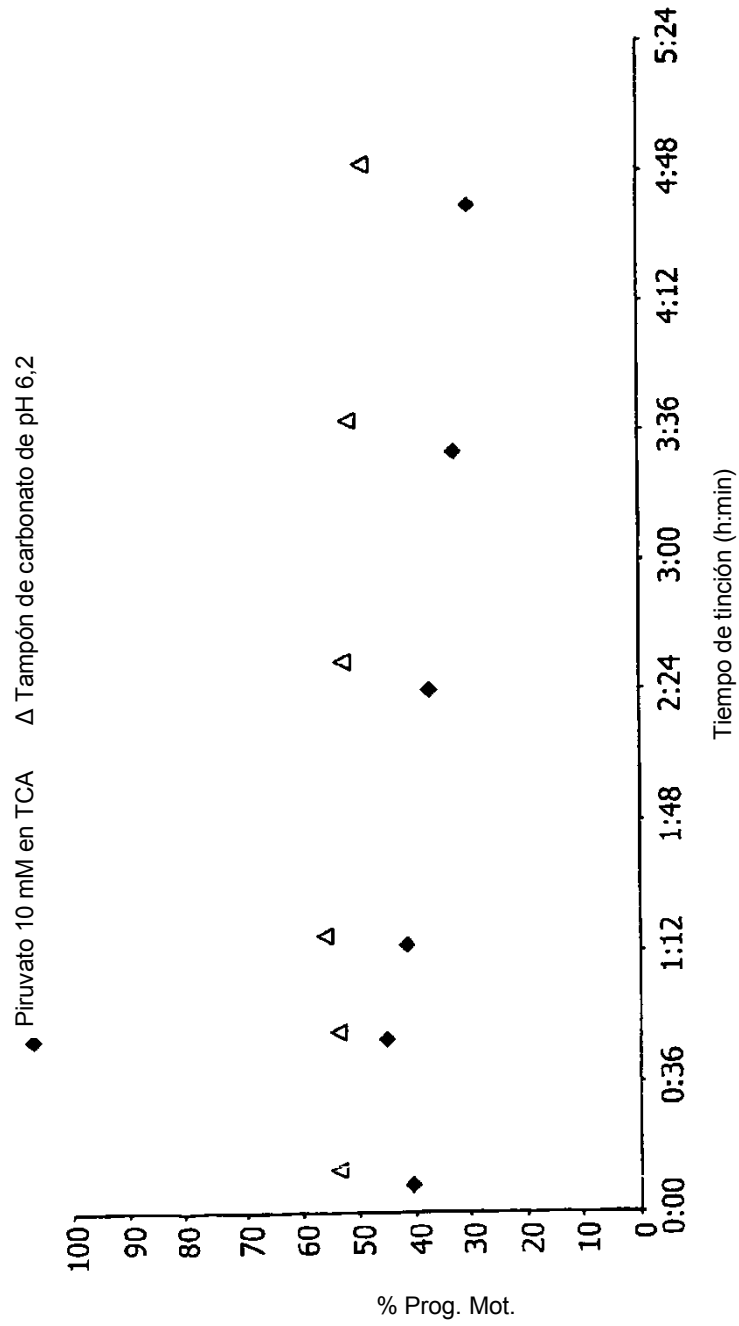


FIG. 7

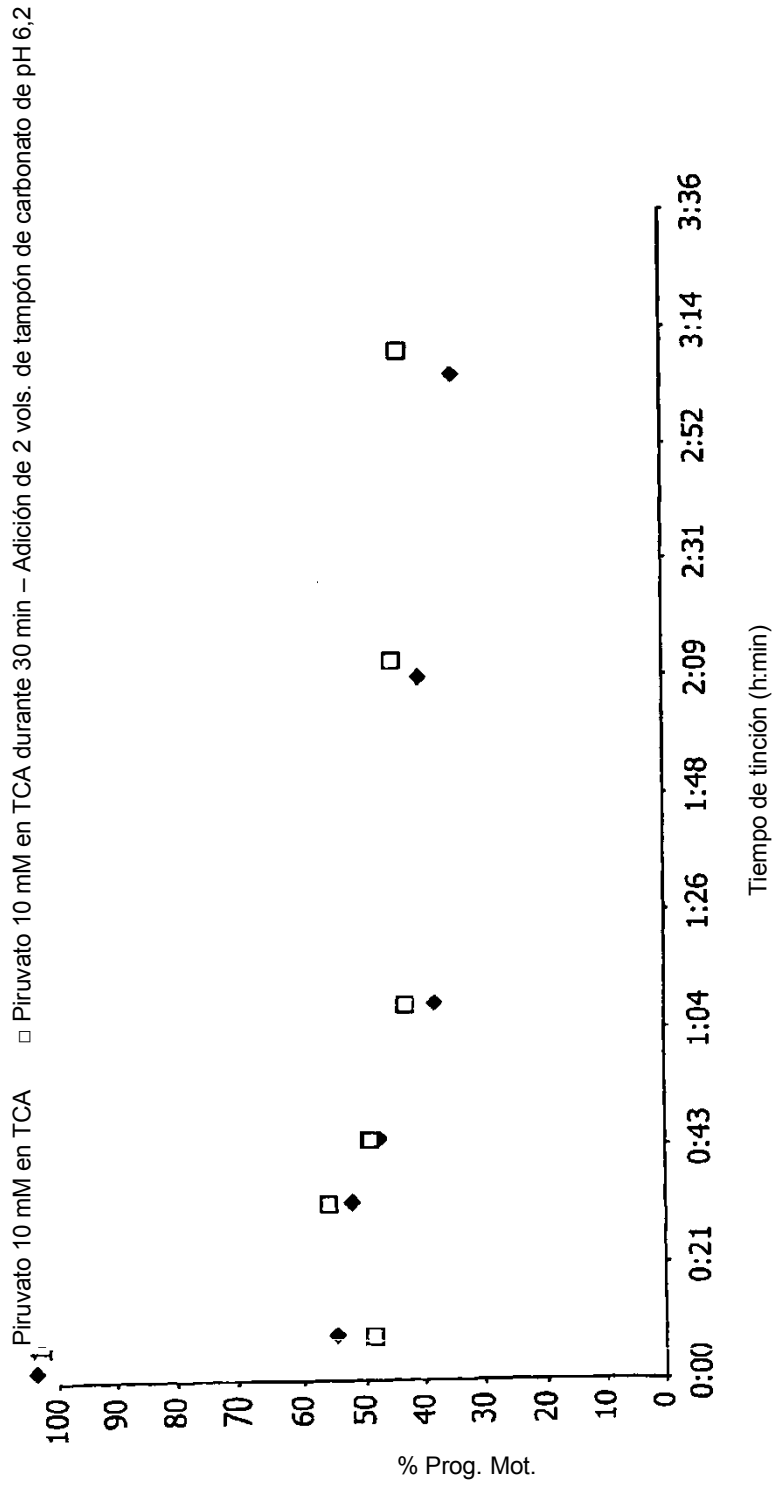


FIG. 8

◆ Piruvato 10 mM en tampón TCA □ Tampón de carbonato de pH 7,3 durante 30 min – Adición de 2 vols. de tampón de carbonato de pH 6,2

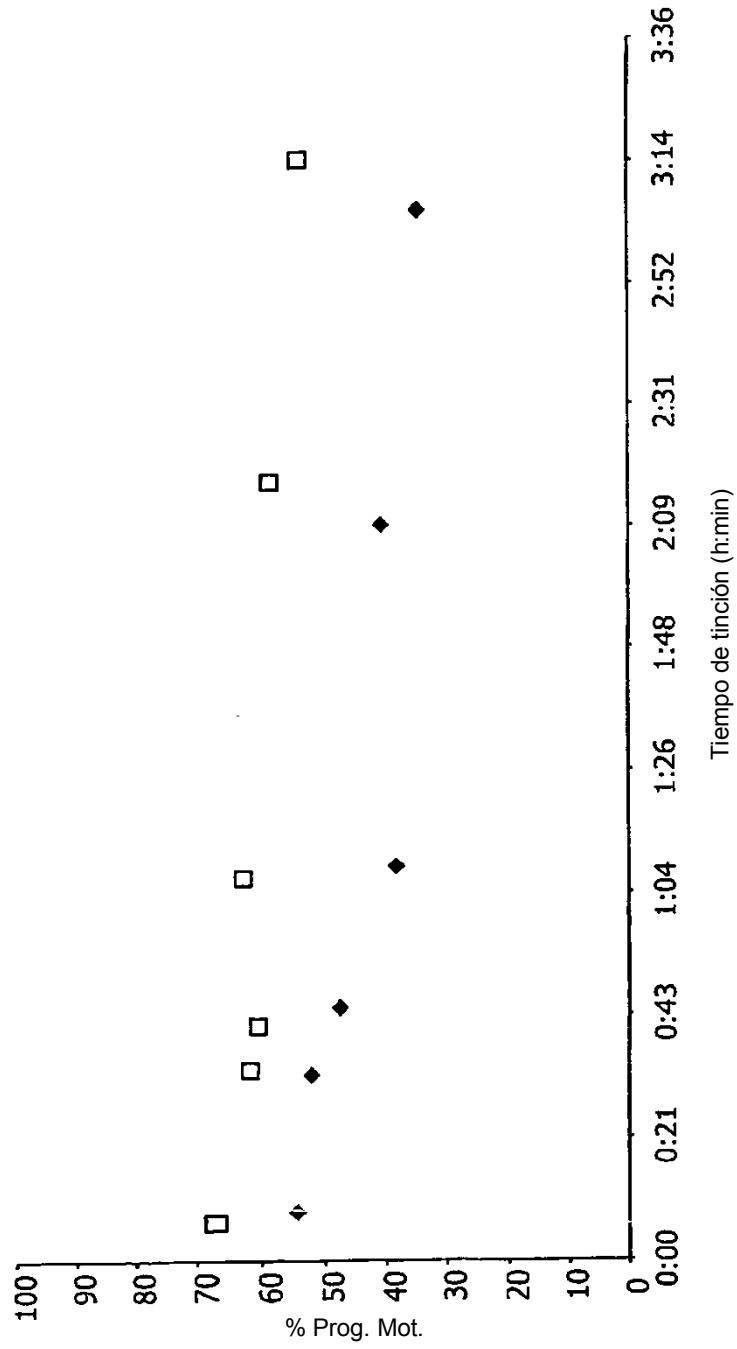


FIG. 9

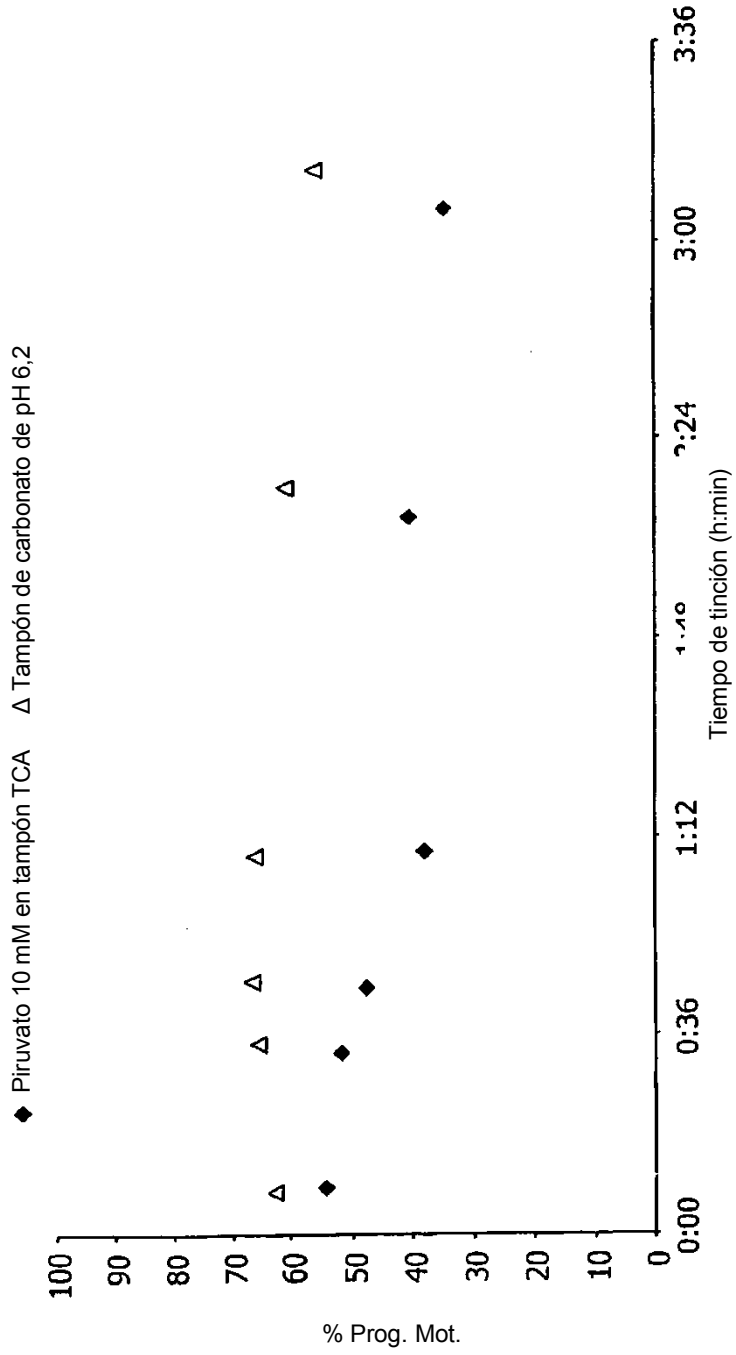


FIG. 10

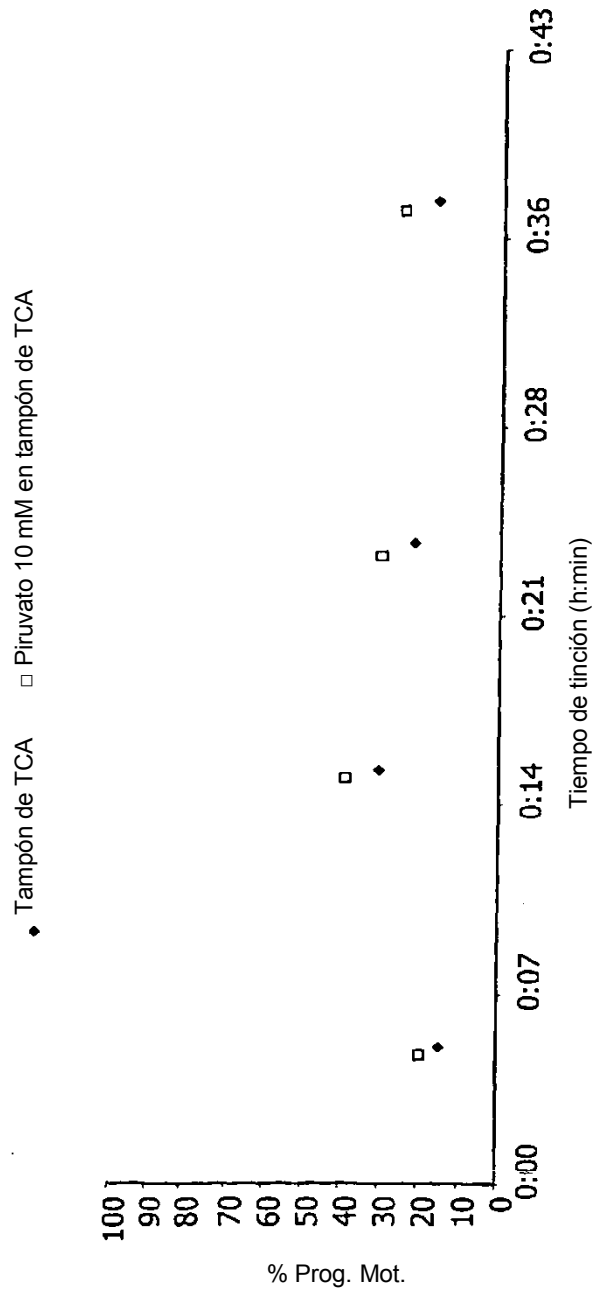


FIG. 11

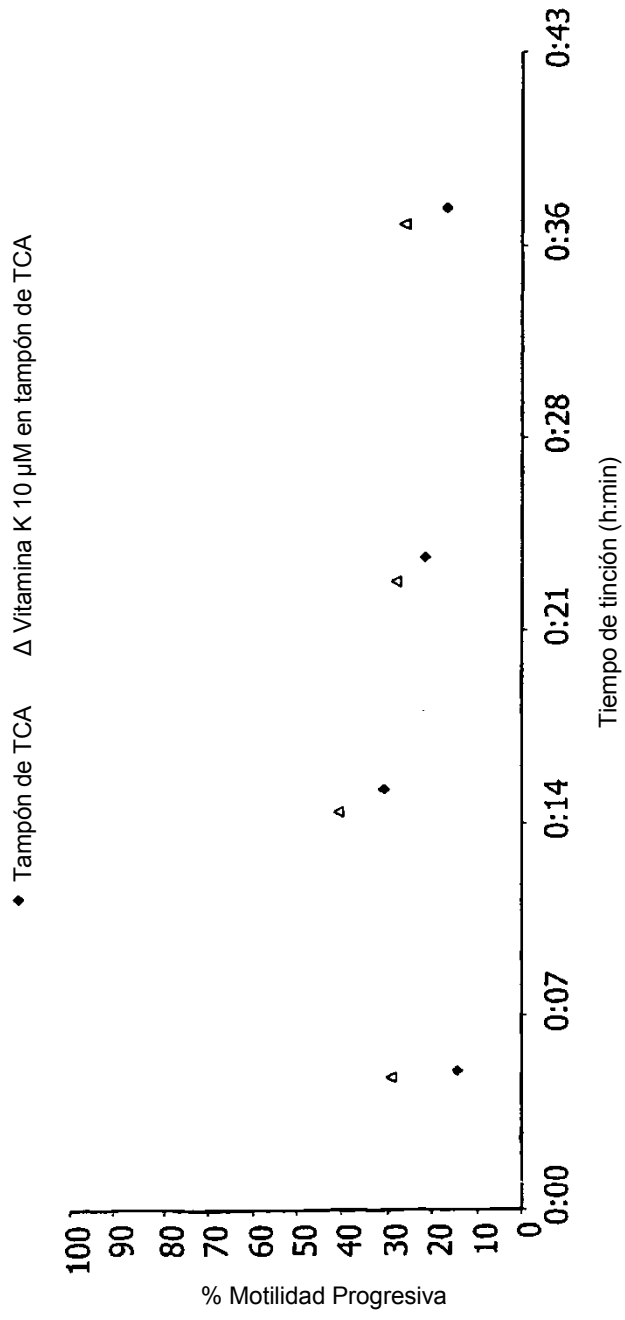


FIG. 12

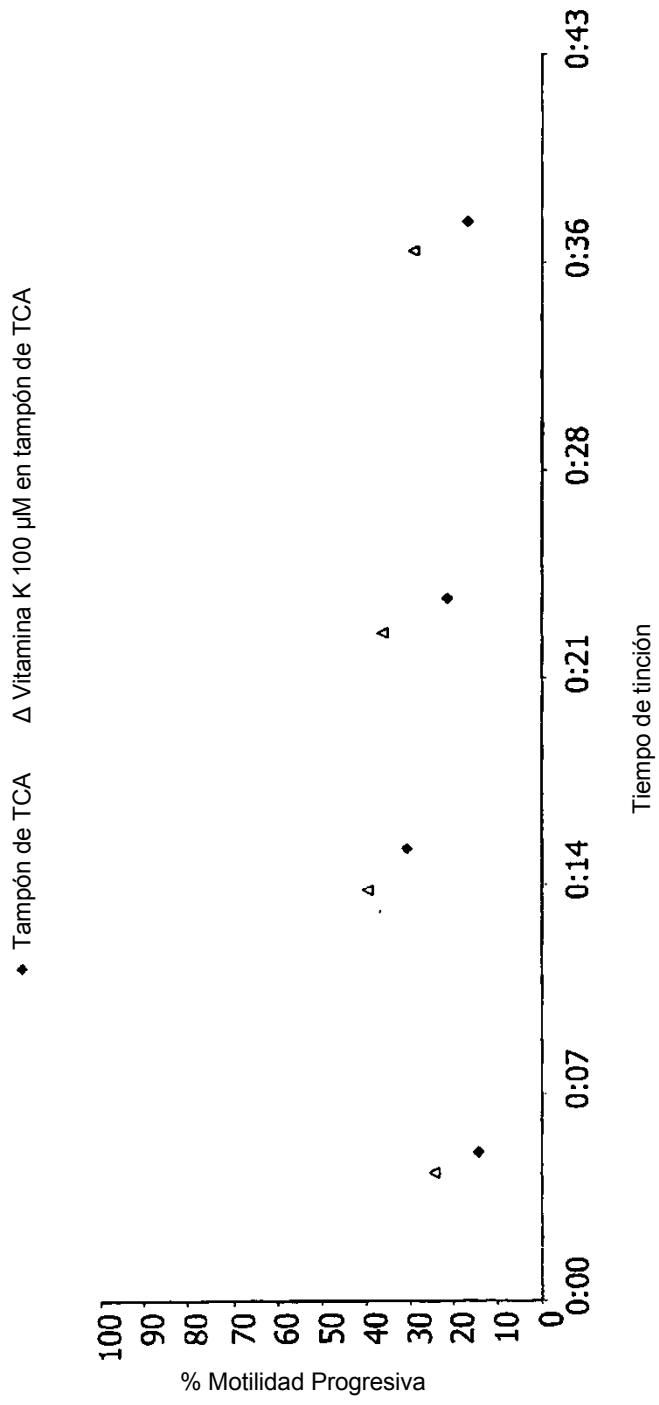


FIG. 13

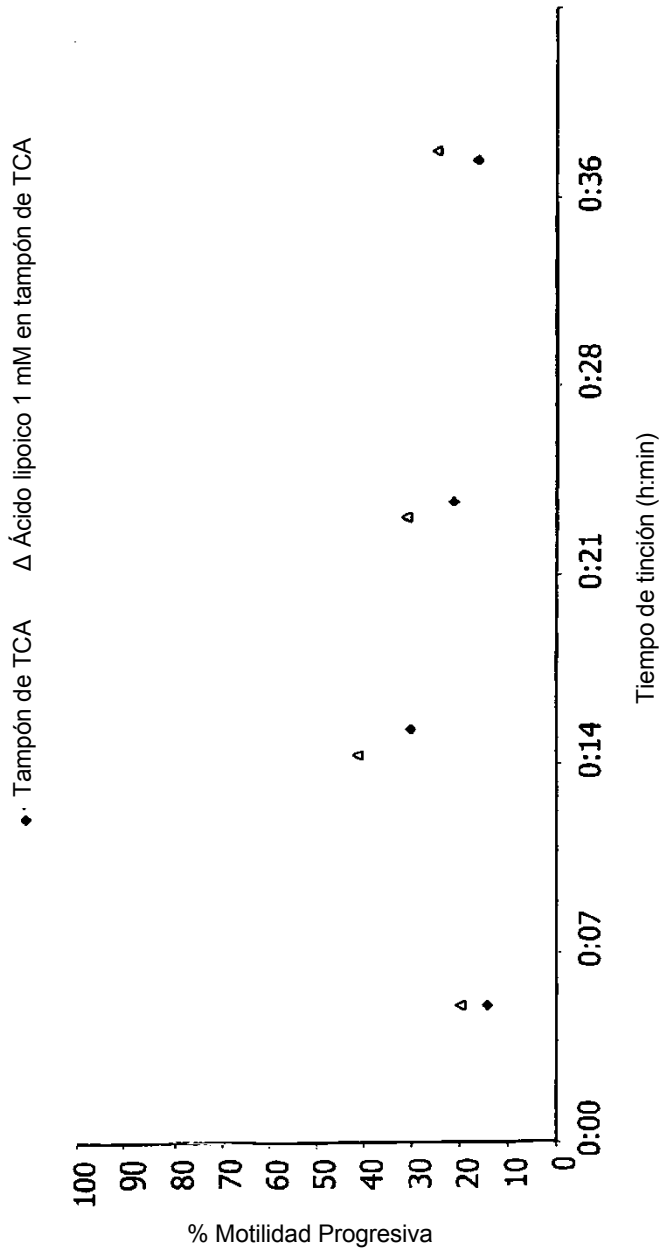


FIG. 14

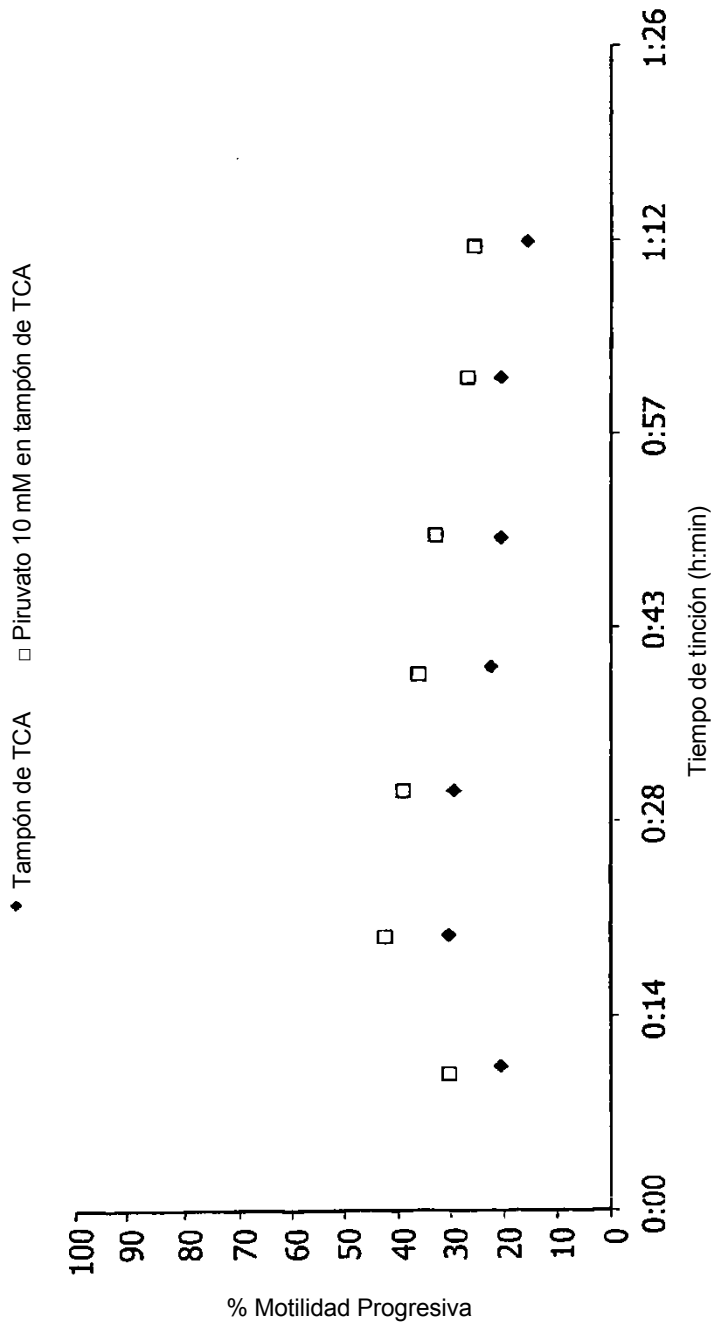


FIG. 15

◆ Tampón de TCA Δ Vitamina K 100 μM en tampón de TCA

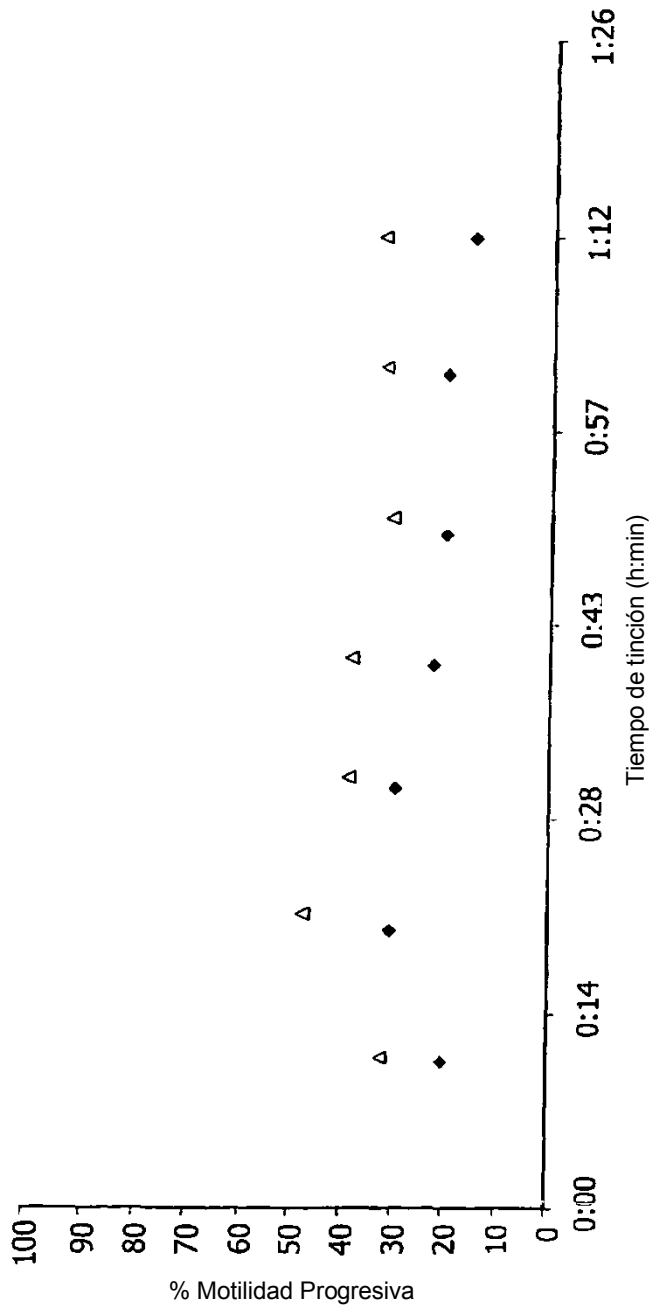


FIG. 16

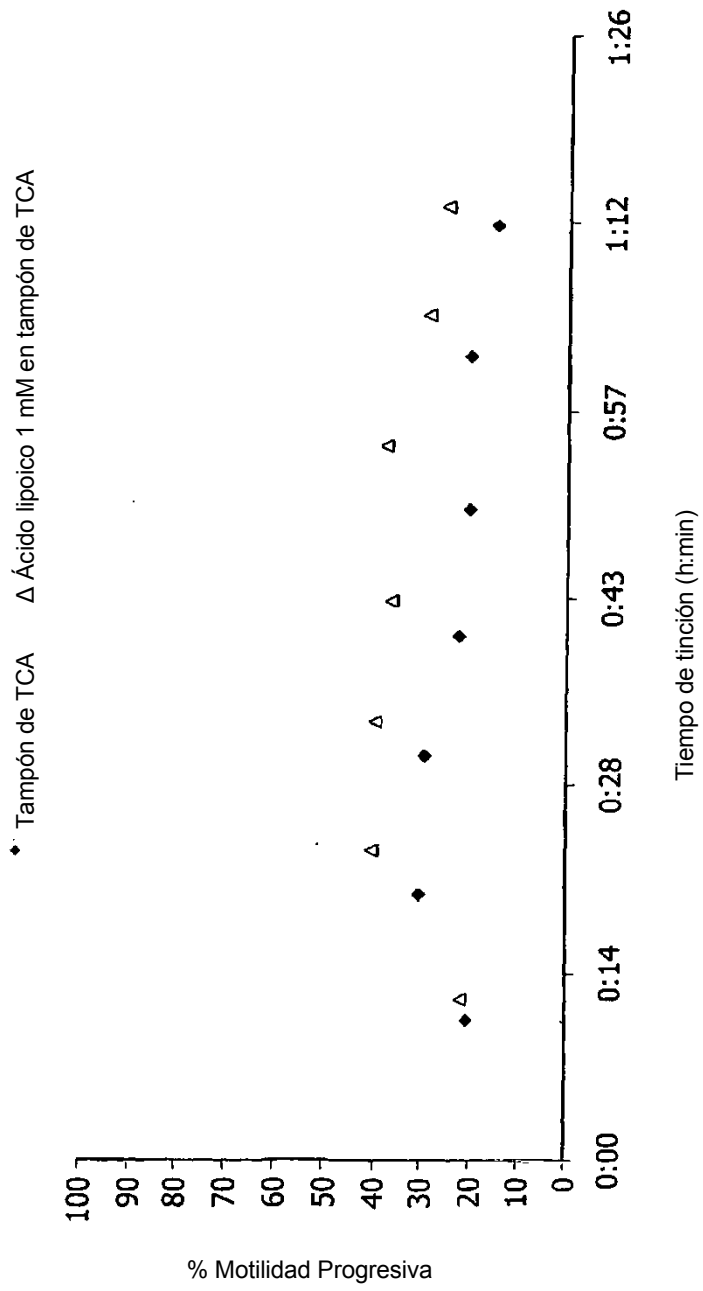


FIG. 17

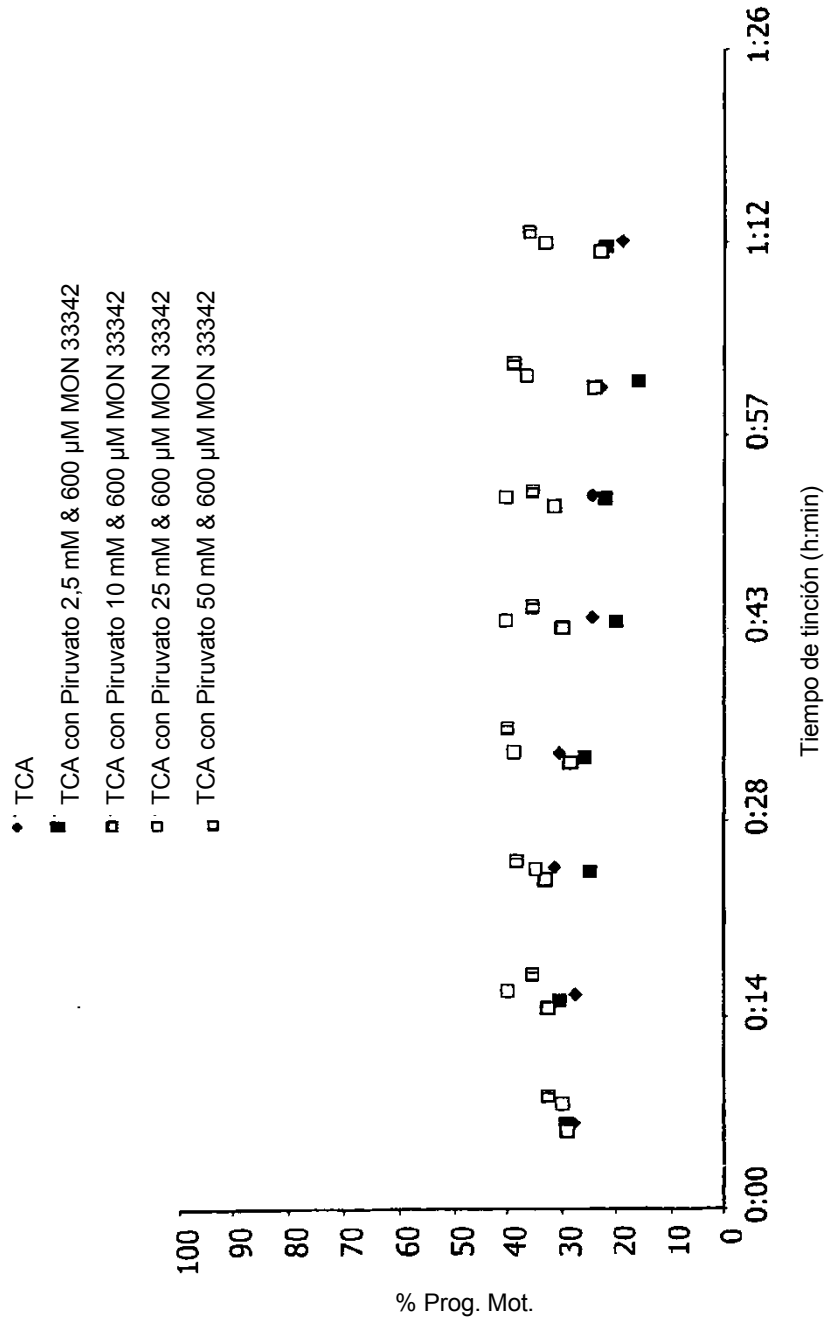


FIG. 18

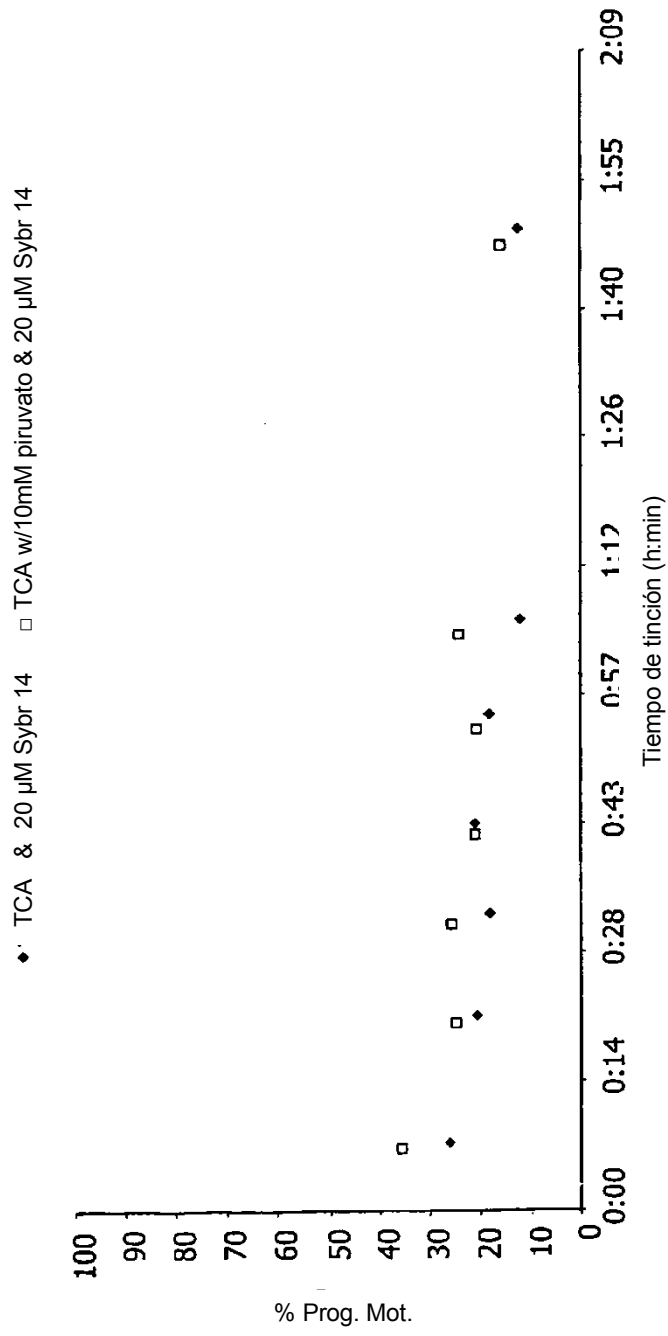


FIG. 19

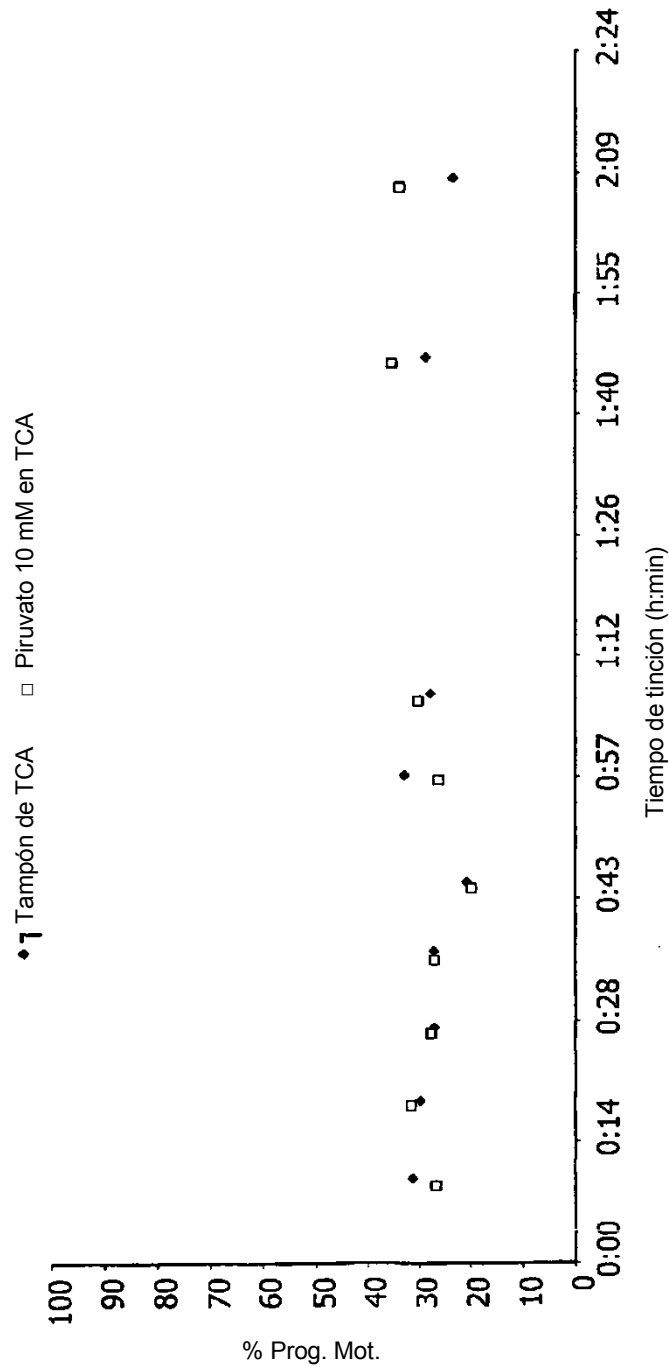


FIG. 20

