

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 855**

51 Int. Cl.:

C12N 5/076 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2003 E 10186250 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 2316933**

54 Título: **Sistemas de conservación y procesamiento de espermatozoides**

30 Prioridad:

13.09.2002 US 410884 P
09.01.2003 US 340881

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2021

73 Titular/es:

XY, LLC (100.0%)
22575 State Highway 6 South
Navasota, TX 77868, US

72 Inventor/es:

MAXWELL, WILLIAM, MAXWELL, CHISHOLM;
HOLLINSHEAD, FIONA, KATE;
O'BRIEN, JUSTINE, KELLIE y
EVANS, GARETH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 813 855 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 procesamiento de espermatozoides

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a la conservación de espermatozoides y al procesamiento de espermatozoides, en general. La invención puede aplicarse a inseminación artificial, fertilización *in vitro*, superovulación, producción de mamíferos no humanos, muestras de esperma y procesamiento de espermatozoides, incluido un procesamiento tal como aspectos de recolección, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación.

Antecedentes de la invención

15 Se ha realizado la fertilización de óvulos de mamíferos no humanos, denominados potencialmente ovocitos, por medio de técnicas de inseminación artificial y de fertilización *in vitro*, para conseguir aumentar las tasas de fertilidad del ganado. Además, se ha logrado una preselección eficaz del sexo en muchas especies de ganado siguiendo el desarrollo de procedimientos seguros y fiables de clasificación, en general, o de separación específica de espermatozoides en poblaciones enriquecidas portadoras de cromosoma X y portadoras de cromosoma Y. La separación de espermatozoides portadores de cromosoma X de los espermatozoides portadores de cromosoma Y, así como las técnicas de recolección, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación, o el procesamiento de espermatozoides y semen en general, se puede lograr tal como se divulga en el presente documento y según se divulga por varias solicitudes de patente, por ejemplo: los documentos PCT/US99/17165, PCT/US01/45023, PCT/US01/15150, PCT/US98/27909, PCT/US01/45237, PCT/US01/18879, PCT/US00/30155, PCT/US01/02304, la patente de Estados Unidos número 6.071.689, la patente de Estados Unidos número 6.372.422, la solicitud divisional de Estados Unidos número 10/081.955, la solicitud provisional de Estados Unidos número 60/400.486 y la solicitud provisional de Estados Unidos número 60/400.971.

Aunque los diversos dispositivos y procedimientos de procesamiento de espermatozoides, en general, y la recolección, la manipulación, la clasificación, el almacenamiento, el transporte, el uso, la fertilización y la inseminación de los espermatozoides se han mejorado en los últimos años, persisten problemas importantes con respecto al mantenimiento de la calidad del esperma, tales como la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad, y la conservación y la estimulación de los espermatozoides, especialmente con respecto a los procedimientos de inseminación artificial (*in vivo*) y de fertilización *in vitro* (FIV). Una consecuencia potencial es la reducción de las tasas de fertilización. La calidad del esperma, tal como la viabilidad del esperma separado en poblaciones enriquecidas portadoras de cromosoma X y portadoras de cromosoma Y, que podría compararse directamente *in vitro* (por ejemplo, junto con procedimientos de FIV) e *in vivo* (por ejemplo, junto con procedimientos de inseminación artificial), generalmente se reduce durante el procesamiento tradicional de espermatozoides. De forma más general, las técnicas de procesamiento tradicionales que abordan la viabilidad, la movilidad, la funcionalidad, la conservación, la estimulación, la fertilización y la inseminación del esperma pueden no haber proporcionado tasas de fertilización o una calidad de esperma preferidas o incluso adecuadas, por ejemplo.

Como ejemplo de procesamiento tradicional de esperma, las técnicas de clasificación de espermatozoides para la cría de mamíferos no humanos pueden estar limitadas, por ejemplo, con respecto a la calidad de los espermatozoides, tal como la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad de los espermatozoides, y las tasas de fertilización, así como otras características o aspectos potencialmente limitados. Por ejemplo, si el aparato clasificador se encuentra a una distancia relativamente grande de los machos, o si el aparato clasificador se encuentra a una distancia relativamente grande de las hembras receptoras que se van a inseminar o de los óvulos que se van a fertilizar con esperma procesado, la calidad de los espermatozoides, las tasas de fertilización, u otras características o aspectos pueden verse afectados negativamente. Algunas de las técnicas o algunas técnicas tradicionales pueden lograr en un determinado grado la viabilidad, la movilidad o la funcionalidad de los espermatozoides y las tasas de fertilización deseadas, mientras se aborda, por ejemplo, la conservación del esperma durante el transporte al aparato clasificador. Sin embargo, pueden ser deseables técnicas adicionales que logren una calidad suficiente de los espermatozoides, tal como viabilidad, movilidad y funcionalidad, y otros aspectos tales como estimulación, conservación y tasas de fertilización mantenidas o mejoradas de los espermatozoides, especialmente para cualquiera o una combinación de varias etapas de procesamiento de esperma. Los aspectos de procesamiento pueden incluir, por ejemplo, recolección, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación, y especialmente la conservación de los espermatozoides clasificados desde el aparato clasificador hasta el sitio de fertilización (potencialmente por medio de muestras individuales recolectadas o "pajas"), o en cualquier otra etapa del procesamiento de los espermatozoides.

Como otro ejemplo de las limitaciones del procesamiento tradicional de esperma, las técnicas de procesamiento tradicionales pueden estar limitadas con respecto a la calidad de los espermatozoides, en general, tal como la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad de los espermatozoides, y la estimulación de los espermatozoides, la conservación de los espermatozoides y las tasas de fertilización debido al tipo y la extensión del procesamiento involucrado. Las técnicas de procesamiento conocidas, tales como la conservación o la clasificación, por ejemplo,

pueden degradar la calidad del espermatozoide y reducir además las tasas de fertilización. La degradación de la calidad del espermatozoide y las tasas de fertilización puede haber demostrado previamente ser problemática en circunstancias que pueden haber requerido etapas adicionales de conservación de los espermatozoides, tales como en circunstancias en las que el aparato clasificador se encuentra a una distancia relativamente grande de los machos o cuando el aparato clasificador se encuentra a una distancia relativamente grande de las hembras receptoras que se van a inseminar o a fertilizar de otro modo con espermatozoides procesados. Sin embargo, es posible que la degradación potencialmente identificada de la calidad del espermatozoide y de las tasas de fertilización no se haya abordado hasta ahora en el contexto de la conservación de los espermatozoides, o incluso se haya identificado que está relacionada con la conservación de los espermatozoides o el procesamiento de los espermatozoides en general, ya que puede haberse entendido que en realidad las técnicas tradicionales de conservación han contribuido a los efectos adversos sobre la calidad del espermatozoide, las tasas de fertilización u otras características o resultados relevantes.

Se puede haber entendido tradicionalmente que las etapas de procesamiento adicionales en el procesamiento de espermatozoides o semen que tiene una concentración de espermatozoides degradarían la calidad del espermatozoide y reducirían las tasas de fertilización hasta tal punto que, en general, se evitarían etapas de procesamiento adicionales. Específicamente, también se puede haber entendido tradicionalmente que etapas de procesamiento tales como la conservación, específicamente la criopreservación, y la clasificación podrían ser demasiado perjudiciales para los espermatozoides, especialmente en secuencias de procesamiento que incorporan tanto criopreservación como clasificación. Además, es posible que incluso se haya sugerido y enseñado en procedimientos tradicionales que la conservación de espermatozoides, tales como la criopreservación, proporcionada después de etapas de procesamiento previas a fin de conservar los espermatozoides para procedimientos posteriores, tales como técnicas *in vivo* o *in vitro*, no podrían realizarse sin comprometer los espermatozoides y la técnica en sí hasta tal punto que los resultados de los procedimientos posteriores se verían afectados de forma perjudicial. En consecuencia, dichas preocupaciones pueden incluso haberse demostrado en procedimientos tradicionales de procesamiento de espermatozoides, alejándose en la explicación de etapas de procesamiento posteriores, tales como clasificación y criopreservación, o etapas de procesamiento que incorporan múltiples etapas de criopreservación.

Divulgación de la invención

La presente invención puede abordar la diversidad de problemas previamente identificados y potencialmente no abordados asociados con la reducción de la calidad de los espermatozoides, tal como la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad, y la estimulación, la conservación y otras características o aspectos de los espermatozoides. Los espermatozoides que se pueden haber procesado, o que serán procesados, mediante una o más etapas de recolección, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación y las posibles reducciones de las tasas de fertilización se abordan con más detalle. La presente invención también puede abordar la diversidad de problemas asociados con la calidad como espermatozoide de los espermatozoides que se han separado en poblaciones enriquecidas portadoras de cromosoma X y portadoras de cromosoma Y, potencialmente los espermatozoides clasificados mediante técnicas tales como la clasificación de flujo, y la reducción potencial en las tasas de fertilización. De forma más general, la presente invención puede abordar las tasas de fertilización tradicionalmente bajas de la inseminación artificial *in vivo* y la fertilización *in vitro*, y problemas de calidad de los espermatozoides tal como la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad de los espermatozoides. La presente invención también aborda cuestiones tales como la estimulación, la conservación y tasas de fertilización, así como características de fertilidad mejoradas o mantenidas, tales como la tasa de desarrollo de blastocistos, la capacidad de desarrollo *in vivo*, la tasa de preñez y la división celular, logrando resultados que pueden haber sido inesperados para los expertos en la técnica. Además, la presente invención aborda el número de espermatozoides procesados potencialmente necesarios para obtener las tasas de preñez deseadas, teniendo en cuenta además las tasas de preñez obtenidas respectivamente a partir del espermatozoide conservado clasificado y no clasificado.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir una muestra de espermatozoide de mamífero no humano para fertilización *in vitro*, que incluye la etapa de obtener espermatozoides; y se caracteriza por que el procedimiento incluye además las etapas de criopreservar los espermatozoides, descongelar los espermatozoides, clasificar los espermatozoides, criopreservar los espermatozoides, descongelar los espermatozoides dos veces criopreservados; y establecer una muestra de espermatozoide a partir de los espermatozoides dos veces criopreservados, en el que la muestra de espermatozoide consiste en una muestra seleccionada del grupo que consta de una paja, un gránulo, una dosis de inseminación y una muestra de espermatozoide preparada.

Según un segundo aspecto, se proporciona un procedimiento para producir una muestra de espermatozoide de mamífero no humano para inseminación artificial, que incluye la etapa de obtener espermatozoides; y se caracteriza por que el procedimiento incluye además las etapas de criopreservar los espermatozoides, descongelar los espermatozoides, clasificar los espermatozoides, criopreservar los espermatozoides, descongelar los espermatozoides dos veces criopreservados; y establecer una muestra de espermatozoide a partir de los espermatozoides dos veces criopreservados, en el que la muestra de espermatozoide consiste en una muestra seleccionada del grupo que consta de una paja, un gránulo, una dosis de inseminación y una muestra de espermatozoide preparada.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo de un ejemplo de un procedimiento de procesamiento de esperma.

La figura 2 es un diagrama de flujo de un segundo ejemplo de un procedimiento de procesamiento de esperma.

5 La figura 3 es un diagrama de flujo de otro ejemplo de un procedimiento de procesamiento de esperma.

La figura 4 es un diagrama de flujo de un ejemplo de un procedimiento de procesamiento de esperma.

10 La figura 5 es un diagrama de flujo de un ejemplo de un procedimiento de procesamiento de esperma, potencialmente proporcionado en combinación con el ejemplo de la figura 1, en algunos ejemplos.

Modos de llevar a cabo de la invención

15 Se discutirán a continuación técnicas de procesamiento y conservación del semen y los espermatozoides y técnicas de conservación, estimulación, fertilización e inseminación que abordan una o más características de los espermatozoides o la calidad del esperma, tales como la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad de los espermatozoides, y las tasas de estimulación, conservación y fertilización. También se discutirán ejemplos de características de fertilidad mejoradas o mantenidas, tales como la tasa de desarrollo de blastocistos, la capacidad de desarrollo *in vivo*, la tasa de preñez o la división celular. Las características de los espermatozoides o la calidad del esperma se pueden abordar en el contexto de diversas técnicas de procesamiento, tales como recolección, 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 anteriormente mencionados o mencionados adicionalmente en el presente documento, tales como, por ejemplo, la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad, y puede incluso considerarse una o una combinación de características de fertilidad de los espermatozoides. La característica de los espermatozoides puede referirse a uno o una combinación de diversos atributos biológicos, químicos, físicos, fisiológicos o funcionales de uno o más espermatozoides, tales como los atributos cromosómicos de la célula, o en algunos ejemplos puede referirse a la calidad de los espermatozoides tal como se ha descrito anteriormente.

25 Las características de fertilidad pueden mejorarse o mantenerse y pueden comprender la tasa de desarrollo de blastocistos, la capacidad de desarrollo *in vivo*, la tasa de preñez o la división celular.

30 Las técnicas de procesamiento de semen o de espermatozoides pueden referirse a cualquiera o una combinación de conservación, estimulación, inseminación, fertilización, clasificación, selección, separación o descongelación, y pueden estar dirigidas específicamente a una cualquiera o una combinación de técnicas de recolección, manipulación, selección, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación.

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

40 Los espermatozoides pueden mantenerse o mejorarse mediante los procedimientos descritos en el presente documento y proporcionados como conservación de espermatozoides o, más ampliamente, procesamiento de espermatozoides, tal como por medio de etapas de procesamiento tales como clasificación de espermatozoides o conservación de espermatozoides, y pueden materializarse de acuerdo con técnicas de fertilización y de inseminación. Los ejemplos pueden comprender algunos aspectos de componentes de conservación de espermatozoides u otras técnicas de procesamiento tal como se pueden divulgar en las patentes y solicitudes de patente mencionadas anteriormente, tal como se describe además más adelante.

45 Los espermatozoides también se pueden mantener o mejorar en algunos ejemplos mediante técnicas de conservación y estimulación tal como se describen adicionalmente más adelante, y también en combinación adicional con las técnicas de procesamiento, estimulación, conservación, fertilización e inseminación de las solicitudes de patente y patentes mencionadas anteriormente.

50 Con referencia a la figura 1, las etapas de procesamiento de los espermatozoides de algunos ejemplos se muestran en el diagrama de flujo. Los espermatozoides se obtienen 10 y se crioconservan 20. A continuación, los espermatozoides se descongelan 14 y se realiza una etapa posterior de crioconservación 16. Cada uno de estos aspectos se describe con más detalle a continuación. En la figura 2 se muestra un ejemplo de procesamiento de espermatozoides consistente con los aspectos mostrados en la figura 1. El ejemplo proporciona las etapas 20, 22, 24 y 26 consistentes con el ejemplo de la figura 1, y además establece al menos una muestra de esperma. La muestra de esperma puede comprender cualquier muestra de esperma tal como se ha descrito anteriormente y según la descripción adicional siguiente.

55 La divulgación describe un procedimiento para producir un mamífero no humano, consistente con los ejemplos de la figura 1, tal como se muestra en las etapas 30, 32, 34 y 36 de la figura 3. Los espermatozoides del aspecto 36 fertilizan

al menos un óvulo 28 y se produce un mamífero no humano a partir del, al menos, un óvulo. De nuevo, cada uno de estos aspectos se describe con más detalle a continuación.

La figura 4 muestra ejemplos de procesamiento de espermatozoides según la presente invención. Tal como se muestra, y en una elaboración adicional de los aspectos descritos anteriormente, los espermatozoides pueden obtenerse de una fuente de mamífero no humano, ya sea directamente o en varias combinaciones de etapas, tal como a través de una instalación de almacenamiento. Los espermatozoides se pueden crioconservar 52. Se puede proporcionar la crioconservación tal como se describe adicionalmente en algunos ejemplos de la invención a continuación. Posteriormente, los espermatozoides pueden descongelarse 54. A continuación, puede realizarse un procesamiento adicional 56 en los espermatozoides previamente a otra crioconservación de los espermatozoides 58.

El procesamiento de los espermatozoides, en general, y los procesos descritos anteriormente pueden realizarse independientemente de las técnicas de inseminación y fertilización, o como parte de, y en combinación con, dichas técnicas. Cada uno de los procesos anteriores también se puede realizar con respecto a técnicas de superovulación. En consecuencia, algunos ejemplos son procedimientos para producir un mamífero no humano, tal como se muestra en la figura 5. Después de un procesamiento previo, o en algunos ejemplos tal como se procede con los aspectos 50 a 58, puede fertilizarse 62 al menos un óvulo. En un ejemplo, los espermatozoides pueden descongelarse 60 y puede realizarse la fertilización 62 de al menos un óvulo con los espermatozoides. A continuación, puede producirse un mamífero no humano 64 a partir del óvulo fertilizado por los espermatozoides procesados. En algunos ejemplos se proporcionan etapas de procesamiento adicionales, tales como la clasificación de los espermatozoides, y se realizan preferentemente después de la primera descongelación (54).

Además, los ejemplos de la invención, tales como los descritos anteriormente, respaldan técnicas *in vivo* e *in vitro*. Por consiguiente, una hembra de la especie del mamífero no humano del que se obtuvo el esperma puede inseminarse con los espermatozoides, tales como los espermatozoides procesados previamente, o espermatozoides clasificados y crioconservados, cada uno descrito previamente. Las técnicas de inseminación pueden comprender inseminar a la, al menos una, hembra con los espermatozoides, que pueden estar descongelados o potencialmente como espermatozoides crioconservados en un estado no descongelado, potencialmente en gránulos u otra configuración de muestra de esperma tal como se ha descrito anteriormente. Se pueden preferir muestras de esperma descongeladas si, por ejemplo, la calidad de los espermatozoides se debe mantener o mejorar como parte del procesamiento de los espermatozoides o la producción de mamíferos no humanos. Sin embargo, podrían utilizarse células crioconservadas sin descongelar para inseminación y preferirse, si, por ejemplo, es aceptable un descongelamiento de los espermatozoides dentro de la hembra, y si se desea una reducción de las etapas fuera del útero, tal como para reducir el procesamiento de los espermatozoides. Además, se pueden realizar técnicas de inseminación artificial y fertilización *in vitro*, en general, según la presente invención, con células crioconservadas sin descongelar, independientemente de, o en combinación con, otros aspectos de procesamiento tales como descongelación, etapas posteriores de crioconservación, clasificación u otros aspectos. También se pueden realizar etapas de procesamiento tales como clasificación de los espermatozoides.

La inseminación puede realizarse con al menos una muestra de esperma tal como las descritas anteriormente. Puede fertilizarse al menos un óvulo de la hembra y producirse un mamífero no humano a partir del, al menos un, óvulo fertilizado. Según los procedimientos *in vitro*, se puede realizar la fertilización *in vitro* de al menos un óvulo. El, al menos un, óvulo fertilizado se puede transferir a una hembra receptora y se puede producir un embrión de mamífero no humano, o en algunos ejemplos, se puede producir un mamífero no humano, a partir del, al menos un, óvulo fertilizado.

Las técnicas de superovulación también están incluidas en la presente invención. Una hembra de una especie de mamífero no humano puede superovular. En algunos ejemplos, la hembra superovulada puede inseminarse con los espermatozoides y al menos un óvulo fertilizado. En otros ejemplos, puede obtenerse al menos un óvulo de la hembra superovulada y fertilizarse *in vitro* el, al menos un, óvulo. El, al menos un, óvulo fertilizado puede transferirse a una hembra receptora mediante técnicas de inseminación artificial o de fertilización *in vitro*.

Tal como se ha mencionado anteriormente, los procedimientos de procesamiento de espermatozoides pueden comprender el establecimiento de al menos una muestra de esperma de los espermatozoides. En consecuencia, los ejemplos de la invención pueden comprender procedimientos de procesamiento de espermatozoides, tales como los que se muestran en la figura 2, que se caracterizan por establecer al menos una muestra de esperma de los espermatozoides. En algunos ejemplos, la, al menos una, muestra de esperma establecida puede ser objeto de una etapa de crioconservación posterior, de forma que la, al menos una, muestra de esperma se crioconserva.

Se pudo haber pensado anteriormente que, de forma consistente con las técnicas de procesamiento convencionales, dichos espermatozoides procesados y dichas muestras de esperma establecidas no tendrían la suficiente calidad de esperma o no serían capaces, de otra forma, de fertilizar. La presente invención proporciona que la muestra de esperma es capaz de fertilizar al menos un óvulo de una hembra de mamífero no humano, tal como se puede mostrar en los diversos ejemplos que se describen a continuación, y además la inseminación de dicha hembra con la, al menos una, muestra de esperma, y en algunos ejemplos, la fertilización de al menos un óvulo de un mamífero no humano hembra con la, al menos una, muestra de esperma. Los aspectos de muestras de esperma capaces de fertilización se

5 extienden en algunos ejemplos a la capacidad de fertilización de una especie de un mamífero no humano hembra superovulado, y la inseminación de dicha hembra superovulada con la, al menos una, muestra de esperma. Los aspectos de las muestras de esperma capaces de fertilización también se extienden en algunos ejemplos a la capacidad de fertilización *in vitro* de al menos un óvulo, y la fertilización *in vitro* de al menos un óvulo con la, al menos una, muestra de esperma. Otros ejemplos proporcionan el establecimiento de al menos una muestra de esperma capaz de inseminar al menos una hembra de mamífero no humano, y la inseminación de dicha, al menos una, hembra con dicha, al menos una, muestra de esperma. La fertilización de una pluralidad de óvulos, e incluso la producción de un embrión de mamífero no humano, un embrión de mamífero no humano que puede transferirse a una hembra receptora, y más generalmente la producción de un mamífero no humano, tal como una cría de mamífero no humano, se proporcionan de forma consistente con la capacidad de fertilización de la muestra de esperma y los aspectos adicionales descritos anteriormente. Los ejemplos de la invención que abordan la capacidad de la muestra de esperma pueden comprender además la producción de al menos un animal de un sexo preseleccionado a partir de dichos espermatozoides procesados criopreservados. De nuevo, las muestras de esperma pueden establecerse en consecuencia y pueden configurarse como una paja, un gránulo, una dosis de inseminación o una muestra de esperma preparada.

10 Cada uno de los ejemplos descritos anteriormente, y los que se describen adicionalmente a continuación, pueden considerarse desviaciones del procesamiento tradicional de espermatozoides, la producción de mamíferos no humanos, la producción de embriones de mamíferos no humanos y el establecimiento de muestras de esperma. Se ha considerado tradicionalmente que dicho procesamiento de espermatozoides no podía garantizar suficientemente la calidad del esperma o proporcionar tasas adecuadas de inseminación, fertilización o preñez. Sin embargo, y tal como se ha enseñado en las diversas referencias citadas en el presente documento, los espermatozoides pueden de hecho procesarse para lograr, por ejemplo, la clasificación de los espermatozoides, potencialmente para diferenciar los espermatozoides como portadores de cromosoma X o portadores de cromosoma Y, en algunos casos para proporcionar la preselección del sexo de un embrión de mamífero no humano o de un mamífero no humano. La presente invención también proporciona dicho procesamiento, y en algunos ejemplos preferidos, aspectos adicionales de conservación que hasta ahora se pensaba tradicionalmente que no eran comercialmente viables, ni incluso posibles, y que hasta ahora proporcionaban una solución a los problemas previamente identificados pero no abordados.

15 Hasta la fecha, el semen, y en particular los espermatozoides, han podido obtenerse y procesarse de otro modo a partir de mamíferos no humanos según la presente invención, tales como équidos, bóvidos, félicos, ovidios, cánidos, búfalos, bueyes, alces o porcinos, u otras especies de mamíferos no humanos. Además, algunos ejemplos pueden proporcionar la obtención y el procesamiento de semen o espermatozoides de especies de mamíferos no humanos apreciadas, especies de mamíferos no humanos en peligro de extinción, individuos raros de una especie de mamíferos no humanos e incluso de especímenes o individuos zoológicos. El mamífero no humano o el embrión de mamífero no humano resultante puede producirse según las técnicas descritas anteriormente y tal como se describe adicionalmente a continuación. Se pueden establecer muestras de esperma, en algunos ejemplos, tal como se ha descrito anteriormente.

20 Las muestras de esperma se criopreservan, tal como mediante congelación, utilizando diversas técnicas de conservación, tales como la congelación en un criodiluyente tamponado con Hepes. Los espermatozoides se pueden proporcionar como gránulos o pajas y se pueden descongelar utilizando diversas técnicas de descongelación, por ejemplo, con espermatozoides de carnero. Se pueden proporcionar otras muestras de esperma mediante el procesamiento de los espermatozoides, y pueden o no criopreservarse cuando se establecen como una muestra de esperma o cuando se proporcionan para inseminar o fertilizar un óvulo.

25 Se pueden introducir uno o más aditivos, individualmente o en combinación, en el semen, los espermatozoides o la muestra de esperma. En un ejemplo, se puede introducir un criodiluyente en la muestra de esperma para conservar los espermatozoides. La introducción del aditivo o de los aditivos, tales como un criodiluyente, en la muestra de esperma y, en algunos ejemplos, como etapa de criopreservación, potencialmente denominada congelación, puede mantener o mejorar los espermatozoides y puede mantener o mejorar aún más la calidad del esperma, la calidad de los espermatozoides, tal como la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad de los espermatozoides, y puede mantener o mejorar las tasas de estimulación y de fertilización y, potencialmente, una o más características de los espermatozoides. En otros ejemplos, podría eliminarse de la muestra de esperma un aditivo o aditivos, tales como un criodiluyente, individualmente o en combinación. La eliminación del criodiluyente u otros aditivos de la muestra de esperma, y en algunos ejemplos con etapas de criopreservación, puede mantener o mejorar los espermatozoides y puede mantener o mejorar aún más la calidad del esperma, tal como mantener o mejorar la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad de los espermatozoides, y tasas de fertilización, y potencialmente una o más características de los espermatozoides.

30 Los espermatozoides también se pueden mantener o mejorar en algunos ejemplos de las técnicas divulgadas, y la calidad de los espermatozoides puede mantenerse o mejorarse adicionalmente, tal como el mantenimiento o la mejora de la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad de los espermatozoides y potencialmente una o más características de los espermatozoides. Además, las tasas de fertilización pueden al menos mantenerse e incluso mejorarse tal como se describe más adelante. Las características de fertilización también se pueden mantener o mejorar, y las tasas de

desarrollo de blastocistos pueden mejorarse, la fertilización monoespérmica al menos se mantiene e incluso se mejora, y las tasas de escisión al menos se mantienen e incluso se mejoran. En algunos ejemplos, la muestra de esperma se puede conservar, tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo mediante crioconservación, tal como congelación, u otras técnicas de conservación tales como las descritas en las solicitudes de patente mencionadas anteriormente.

5 La calidad del esperma se mantiene en los ejemplos tal como se describe más adelante. Sin embargo, debe interpretarse que el mantenimiento de la calidad del esperma abarca los aspectos de mejora asociados con los espermatozoides. En algunos ejemplos, puede existir una movilidad mejorada, una viabilidad mejorada y una funcionalidad mejorada de los espermatozoides.

10 En consecuencia, pueden introducirse criodiluentes u otros aditivos, individualmente o en combinación, en la muestra de esperma para conservar o estimular el esperma. En un ejemplo, la introducción del criodiluyente u otros aditivos en la muestra de esperma contribuye a la conservación de los espermatozoides mediante crioconservación, congelando la muestra de esperma y, por lo tanto, manteniendo o mejorando los espermatozoides y manteniendo o mejorando aún más la calidad del esperma, tal como al menos manteniendo o incluso mejorando la viabilidad, la
15 movilidad y la funcionalidad de los espermatozoides, y potencialmente una o más características de los espermatozoides. Tal como se ha mencionado anteriormente, el criodiluyente u otros aditivos pueden introducirse en la muestra de esperma antes de la conservación de la muestra o como conservación de la muestra. A continuación, la muestra puede procesarse mediante técnicas de recolección, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación tal como se describe en las solicitudes de patente y patentes mencionadas
20 anteriormente.

En un ejemplo, el criodiluyente u otros aditivos, individualmente o en combinación, se pueden introducir en una muestra de esperma previamente recolectada y la muestra se crioconserva, tal como mediante congelación, operación seguida de una descongelación de la muestra y el procesamiento posterior, incluidas técnicas de procesamiento de
25 recolección, manipulación, clasificación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación. Una de dichas etapas de procesamiento puede proporcionarse como clasificación y, en algunos ejemplos, como la separación de los espermatozoides portadores de cromosoma X de los espermatozoides portadores de cromosoma Y, potencialmente en una muestra o muestras de población de alta pureza. Se pueden lograr varios beneficios mediante esta técnica de procesamiento de espermatozoides, incluido el mantenimiento de la calidad del esperma. Por ejemplo, varios
30 procedimientos de clasificación tal como se describen en las solicitudes de patente y las patentes mencionadas anteriormente logran una separación de los espermatozoides portadores de cromosoma X de los espermatozoides portadores de cromosoma Y mientras se minimiza el daño a los espermatozoides viables. Además, los espermatozoides no viables, la contaminación o el criodiluyente u otros aditivos, por ejemplo, pueden eliminarse mediante tales técnicas de separación. Además, se pueden mantener o mejorar otros aspectos de la calidad del
35 esperma, particularmente el de la viabilidad, la movilidad y la funcionalidad de los espermatozoides. La muestra de esperma se puede estimular adicionalmente durante el procesamiento para mantener o mejorar la calidad del esperma tal como se ha descrito anteriormente. Uno de estos procedimientos de procesamiento de esperma conocido en la técnica se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.135.759, que describe una técnica de clasificación mediante un citómetro de flujo.

40 El procesamiento de los espermatozoides se puede realizar clasificando los espermatozoides tal como se ha descrito anteriormente, o en algunos ejemplos, según el proceso siguiente. La clasificación puede comprender, en algunos ejemplos, como una selección de espermatozoides basándose en al menos una característica deseada, potencialmente características de calidad de los espermatozoides, tales como viabilidad, movilidad, funcionalidad,
45 estimulación y conservación, o una o una combinación de varias características de espermatozoides tales como atributos biológicos, químicos, físicos, fisiológicos o funcionales de uno o más espermatozoides, tales como atributos cromosómicos de la célula. Los espermatozoides se pueden teñir, preferiblemente con Hoechst 33342 o una tinción o un tinte similar, o en combinación con dichas tinciones o tintes, y los espermatozoides diferenciarse basándose en la tinción y la selección. A continuación, las células pueden separarse basándose en la diferenciación y después recolectarse. Los espermatozoides pueden procesarse de esta forma según las diversas técnicas de las referencias
50 citadas en el presente documento y, en algunos ejemplos, procesarse para comprender el mantenimiento de la calidad del esperma.

Ejemplo 1

55 En un ejemplo de una técnica de conservación y procesamiento, se dispusieron 200 µl 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. A continuación, las preparaciones en gradiente se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos. Se retiró el sedimento post-Puresperm™, se diluyó lentamente 1:4 con diluyente a base de Tris caliente y se centrifugó
60 a 650 g durante 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el esperma se tiñó, se incubó y se clasificó tal como se ha descrito anteriormente. Como medio de tinción se utilizó el diluyente a base de Tris y como medio de recolección se utilizó Androhep® (Minitub, Alemania) más yema de huevo al 20%.

65 El ejemplo anterior es uno de varios ejemplos de la técnica de la invención, que proporciona la conservación de esperma, tal como mediante crioconservación o congelación, la descongelación del esperma, la identificación del

esperma, tal como mediante tinción, y la clasificación del esperma, tal como en poblaciones portadoras de cromosomas X e Y.

5 Aunque el ejemplo anterior proporciona una técnica de conservación de esperma y una técnica de procesamiento de recolección, conservación, descongelación y separación de esperma, se pueden utilizar otras técnicas. Por ejemplo, se puede realizar una o una combinación de varias técnicas de recolección, manipulación, separación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación como parte de esta técnica de la presente invención. En un ejemplo, se puede recolectar esperma, operación seguida de la separación de los espermatozoides portadores de cromosoma X de los espermatozoides portadores de cromosoma Y. Puede que no sea necesaria una etapa de
10 conservación antes de la separación de los espermatozoides, por ejemplo en circunstancias en las que el aparato clasificador está fácilmente disponible después de la recolección de esperma. La muestra o las muestras de esperma clasificadas pueden entonces conservarse como una etapa adicional y tal como se ha descrito anteriormente, potencialmente para su posterior manipulación, separación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación. La muestra de esperma clasificado puede estimularse adicionalmente durante el procesamiento para mantener o mejorar la calidad del esperma tal como se ha descrito anteriormente. El ejemplo siguiente describe un ejemplo de una técnica de procesamiento.

Ejemplo 2

20 Las muestras clasificadas se centrifugaron a 700 g durante 6 min a temperatura ambiente (24 °C). Se retiró el sobrenadante y el esperma clasificado se pudo utilizar "fresco" para IA o en un sistema de FIV; o el sedimento restante se extendió 1:4 con el criodiluyente a base de Hepes, potencialmente el mismo diluyente que se ha utilizado para una crioconservación inicial del esperma, y se congeló utilizando varias técnicas, tales como las descritas anteriormente y tal como se describen más adelante. El esperma vuelto a congelar y clasificado se descongeló utilizando procedimientos tales como un tubo de vidrio agitado en un baño de agua a 37 °C, y después se pudo utilizar en un sistema de IA o de FIV.

Ejemplo 3

30 El uso de espermatozoides clasificados a partir de gránulos congelados-descongelados en el mamífero ovino con respecto a sistemas de fertilización *in vitro*. El esperma congelado-clasificado y congelado-clasificado-congelado utilizado en un sistema de FIV ovino se diluyó lentamente con 0,5 ml de medio de FIV y, en algunos ejemplos, utilizando el protocolo de FIV ovino, y se centrifugó en un tubo Falcon con tapa hermética a 300 g durante 6 minutos. Se retiró el sobrenadante y el esperma restante se dispuso rápidamente en el pocillo de FIV a una concentración de un millón de espermatozoides móviles/ml. Preferentemente, se requiere un alto estándar de preparación del medio (es decir, uso de huevos de menos de 24 horas, ultracentrifugación de diluyentes de yema de huevo y filtrado meticuloso) y de manipulación de las muestras (es decir, temperatura constante).

40 Otras técnicas de conservación, procesamiento, fertilización e inseminación no requieren incluir una etapa de separación. Por ejemplo, se puede recolectar el esperma, operación seguida de una etapa de conservación y posterior manipulación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación.

45 Además, se pueden realizar una o más etapas de conservación como parte de técnicas de conservación, procesamiento, fertilización e inseminación, o combinaciones de las mismas, comprendiendo dicha conservación en algunos ejemplos la crioconservación, tal como mediante la congelación de la muestra de esperma, y etapas subsiguientes de descongelación, que se realizan antes, al mismo tiempo o después de una o más de otras técnicas de procesamiento.

Ejemplo 4

50 La aplicación de la clasificación de esperma a la cría de ganado y a la vida silvestre puede estar limitada cuando el clasificador se encuentra a una gran distancia del macho o de los machos, tal como se ha descrito anteriormente, pero se vería facilitada por la clasificación de esperma crioconservado y descongelado, tal como esperma congelado-descongelado (Lu KH et al., *Theriogenology* 1999: 52: 1393-1405) y crioconservándolo o volviéndolo a congelar. Se puede lograr una clasificación de alta pureza con una calidad mantenida de esperma de carnero congelado-descongelado después del procesamiento para retirar el criodiluyente. El objetivo de este estudio era evaluar la capacidad funcional de esperma congelado-descongelado después de clasificación y una segunda etapa de crioconservación/descongelación. Se utilizó semen congelado de 2 carneros (n = 2 eyaculados por carnero) a lo largo del estudio. Los tratamientos de esperma posteriores a la descongelación comprendieron (i) no clasificado (Control);
55 (ii) clasificado (Congelado-Clasificado) y (iii) clasificado y después vuelto a congelar (Congelado-Clasificado-Congelado). Se separó esperma X e Y utilizando un clasificador de alta velocidad (SX MoFlo (R), Cytomation, CO, Estados Unidos) después de la incubación con Hoechst 33342 y colorante alimentario para eliminar el esperma no viable. El reanálisis reveló altos niveles de pureza para las muestras enriquecidas en X e Y para todos los tratamientos (87,0 +/- 4,5%). Para la FIV, se inseminaron ovocitos 472 IVM con 1 x 10(6) espermatozoides móviles/ml. Después de 3 h en medio SOF, los ovocitos se transfirieron a medio de escisión Sydney IVF (Cook (R), QLD, Australia) durante 4 días, seguido de medio de blastocistos Sydney IVF (Cook (R)) para un cultivo adicional de 3 días en 5% de O₂:5% de

CO₂:90% de N₂. Se evaluó la escisión de los ovocitos a las 24 y 48 h después de la inseminación (posinseminación, p.i.). A las 52 h p.i., los ovocitos no escindidos se tiñeron con orceína para evaluar la maduración y la fertilización. Los datos de 3 replicados se analizaron mediante ANOVA, Chi-cuadrado y prueba exacta de Fisher. En la inseminación, el % de espermatozoides móviles (+/- SEM) fue superior (P < 0,001) para Congelado-Clasificado (85,8 +/- 2,4%) y Congelado-Clasificado-Congelado (66,7 +/- 7,7%) que para el Control (36,7 +/- 2,1%). La tasa de maduración fue del 95,6% (451/472). La escisión de los ovocitos en un grupo de control partenogenético (sin espermatozoides) fue baja (2/56; 3,6%). La fertilización con Polysperminc fue baja (9/451; 2,0%) y no difirió entre tratamientos.

Tabla 1. Fertilización y desarrollo embrionario temprano de ovocitos después de la incubación con espermatozoides de carnero congelado-descongelado no clasificado (Control), congelado-descongelado y clasificado (Cong-Clas) y congelado-descongelado, clasificado y después congelado-descongelado (Cong-Clas-Cong). Los valores entre paréntesis son porcentajes.

Tratamiento	Nº de ovocitos maduros fertilizados ^d	Nº de ovocitos maduros que experimentan división después de la inseminación		Nº de ovocitos escindidos que forman blastocistos		
		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) ^a
Cong-Clas	110 (63,6)	67 (38,7)	109 (63,0)	24 (22,1)	34 (31,2)	57 (52,3) ^{ab}
Cong-Clas-Cong	94 (57,7)	71 (43,6)	91 (55,8)	23 (25,3) (64,8) ^{bc}	347 (40,7)	59

^dFertilización monoespérmica. Dentro de la columna, los valores con diferentes superíndices difieren (P < 0,05).

Las tasas de fertilización y escisión fueron consistentemente altas en todos los tratamientos. La tasa de desarrollo de blastocistos fue superior para los ovocitos fertilizados con el espermatozoides Cong-Clas-Cong que con el espermatozoides de Control. Estos resultados demuestran que el espermatozoides de carnero congelado-descongelado se puede clasificar por sexo para su uso inmediato o futuro en un sistema de FIV después de una nueva crioconservación.

El ejemplo anterior es uno de varios ejemplos de la técnica de la invención que proporciona conservación de espermatozoides, tal como mediante crioconservación, tal como congelación, descongelación del espermatozoides, clasificación del espermatozoides, tal como en poblaciones portadoras de cromosomas X e Y, conservación de la muestra clasificada, tal como mediante crioconservación o congelación, e incluye además la descongelación de la muestra de espermatozoides para su uso, tal como para fertilización o inseminación.

Se deberán tener en cuenta las tasas de fertilidad respectivos de los procedimientos de conservación y procesamiento, tal como la separación para la clasificación por sexo y la crioconservación de muestras de espermatozoides, tal como se describe en el ejemplo siguiente, y en combinación con crioconservación, descongelación, procesamiento y crioconservación subsiguiente, tal como se divulga en la presente descripción.

Ejemplo 5

Se han producido corderos después de inseminación artificial (IA) con cifras bajas (2-4 x 10⁶) de espermatozoides crioconservados clasificados por sexo. Quedaron preñadas menos ovejas después de la 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 era determinar los números mínimos de espermatozoides congelado-descongelado necesarios para obtener tasas de preñez similares a las obtenidas con el espermatozoides no clasificado.

Una muestra de espermatozoides de eyaculados únicos de 2 carneros se tiñó, se incubó, se analizó y se clasificó utilizando un clasificador de células de alta velocidad modificado (MoFlo®, Cytomation, Fort Collins, CO, Estados Unidos) tal como se ha descrito anteriormente. El espermatozoides se procesó a 15.000-18.000/serc sin clasificación por sexos en tubos de centrifugadora de 10 ml previamente empapados con BSA al 1% en fluido envolvente que contenía 0,2 ml de medio tamponado con Tris y el 20% de yema de huevo (v/v). Para cada muestra, se clasificaron por sexo 1,3 x 10⁶ espermatozoides y se analizaron para determinar la pureza. Las muestras clasificadas y no clasificadas (control) se extendieron con un diluyente tamponado con iones dipolares que contenía el 13,5% de yema de huevo y el 6% de glicerol y se congelaron como 250 ul de gránulos que contenían 5 x 10⁶ espermatozoides. El tiempo de celo se controló en 144 ovejas merinas mediante esponjas de progestágeno (FGA, Vetrepharm A/Asia, Sydney) insertadas por vía intravaginal durante 12 días y una inyección de 400 UI de PMSG (Pregnenol, Vetrepharm A/Asia) al retirar la esponja (SR). Treinta y seis horas después de la SR, se inyectó a 134 ovejas 40 µg 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 la RS con 5, 10, 20 o 40 x 10⁶ espermatozoides congelados-descongelados clasificados o no clasificados. Trece ovejas a las que no se administró GnRH se inseminaron con una dosis comercial de espermatozoides congelado-descongelado no

clasificado. Trece ovejas que no recibieron GnRH se inseminaron con una dosis comercial de esperma congelado-descongelado no clasificado 57-58 h después de la SR. La preñez se diagnosticó mediante ultrasonidos el día 53. Los datos se analizaron por Chi-cuadrado.

5 La movilidad del esperma después de la descongelación fue del 37,8 +/- 1,78% (clasificado) y del 42,9 +/- 0,93% (no clasificado). Siete de 13 (53,8%) ovejas que no recibieron GnRH quedaron preñadas. De las ovejas tratadas con GnRH, la proporción de preñadas se vio afectada por el número de espermatozoides inseminados ($p < 0,05$) pero no por el carnero o el tipo de esperma ($p > 0,05$). Para las ovejas inseminadas con esperma congelado-descongelado clasificado o no clasificado (control), la tasa de preñez fue superior para inseminadas con 10 y 40 x 10⁶ que para 5 y 20 x 10⁶ espermatozoides (tabla 1). Los resultados sugieren que se requiere un mínimo de 40 x 10⁶ espermatozoides clasificados congelados-descongelados inseminados cerca del momento de la ovulación para obtener tasas de preñez comercialmente aceptables.

15 Tabla 1: Preñez después de inseminación intrauterina de ovejas con esperma de carnero congelado-descongelado de control y clasificado.

Dosis (x 10 ⁶ espermatozoides)	Nº de ovejas inseminadas	Nº de ovejas preñadas	% de 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 las columnas diferentes superíndices difieren ($p < 0,05$).

^aEsta investigación fue apoyada por XY, Inc; CO, EE.UU.; The Australian Research Council, Vetrephann A/Asia.

20 **Ejemplo 6**

La capacidad de clasificar y volver a congelar esperma congelado-descongelado aumentaría significativamente la aplicación potencial de la tecnología de procesamiento de esperma tal como la tecnología de asignación de sexo del esperma a aplicaciones tales como la gestión de especies. El esperma de carnero congelado-descongelado, clasificado, vuelto a congelar y descongelado, según algunos ejemplos, parece completamente funcional *in vitro* con una producción de blastocistos superior a la del esperma congelado-descongelado, no clasificado. (Hollingshead FK et al. 2003 Theriogenology 59209). Algunos ejemplos pueden ser especialmente útiles para evaluar la capacidad *in vitro* de embriones no humanos producidos *in vitro* derivados de esperma congelado-descongelado después de clasificación y de una segunda etapa de crioconservación/descongelación.

30 Se utilizó semen congelado de 2 carneros (n = 3 eyaculados por carnero) en una técnica. Los tratamientos de esperma después de la descongelación comprendieron (i) no clasificado (Control); (ii) clasificado (Cong-Clas) y (iii) clasificado y después vuelto a congelar (Cong-Clas-cong). Se separó esperma X e Y utilizando un clasificador de alta velocidad (SX MoFlo®, DakoCytomation, Fort Collins, CO, Estados Unidos) después de incubación con Hoechst 33342 y colorante alimentario para eliminar el esperma no viable. El reanálisis en algunos ejemplos reveló altos niveles (media ± SEM) de pureza para muestras enriquecidas en X e Y para todos los tratamientos (89 ± 1,2%). El día 6 después de la inseminación en una técnica realizada, se transfirieron 2 embriones (estadio de blastocisto o superior) por receptor. Los datos se analizaron por Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher. La supervivencia de los embriones *in vivo* para este ejemplo puede ser similar en todos los tratamientos de esperma (28/64, 43,8% en general) y 20 de 23 (87,0%) corderos sexados fueron del sexo predicho (tabla 2). Estos resultados de ejemplos pueden demostrar una alta capacidad de desarrollo *in vivo* de embriones sexados producidos *in vitro* derivados de esperma de carnero congelado-descongelado después de clasificación y una segunda etapa de crioconservación/descongelación, y un aumento de la aplicación potencial de tecnología de procesamiento de esperma tal como la tecnología de sexado.

Tabla 2: Supervivencia *in vivo* de embriones producidos *in vitro* transferidos derivados de esperma de carnero congelado-descongelado no clasificado (Control), congelado-descongelado y clasificados (Cong-Clas) y congelado-descongelado, clasificado y después congelado-descongelado (Cong-Clas-Cong).

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

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

10 Los procedimientos pueden incluir además una muestra de esperma, tal como se ha definido anteriormente, tal como una paja, y en algunos ejemplos pajas utilizadas en FIV, producidas según cualquiera de los ejemplos descritos anteriormente, tal como cualquiera de entre técnicas de procesamiento, de producción de mamíferos no humanos, de producción de embriones de mamíferos no humanos, de estimulación, de conservación, de fertilización y de inseminación, y proporcionar una calidad de esperma mantenida o mejorada, tal como una paja de viabilidad, movilidad y funcionalidad deseadas, u otras características o combinaciones de características, tales como las características divulgadas en el presente documento, que potencialmente dan como resultado niveles deseables de tasas de fertilización y, en algunos ejemplos, particularmente para mamíferos equinos. La muestra de esperma, tal como al menos una o una pluralidad de pajas, puede ser particularmente adecuada para la producción individual de embriones no humanos.

20 Los procedimientos pueden incluir además un mamífero no humano producido según cualquiera de los ejemplos descritos anteriormente, o pueden incluir un mamífero no humano de sexo predeterminado según los diversos ejemplos que proporcionan muestras de inseminación de espermatozoides que tienen una población enriquecida en espermatozoides portadores de cromosoma X o una población enriquecida en espermatozoides portadores de cromosoma Y, o un mamífero no humano producido según cualquier ejemplo en el que una muestra de inseminación de espermatozoides contiene un número bajo de espermatozoides en comparación con el número típico utilizado para inseminar esa especie particular de mamífero no humano, o se produce progenie de alce según los ejemplos descritos anteriormente.

30 Los ejemplos incluyen además diversas técnicas de procesamiento, conservación, estimulación, fertilización, inseminación y producción de mamíferos no humanos o embriones de mamíferos no humanos tal como se divulgan en el presente documento y que pueden comprender en combinación aspectos divulgados en las solicitudes de patente y referencias mencionadas anteriormente. En consecuencia, los diversos aspectos de procesamiento de semen y espermatozoides proporcionados como sistemas de conservación, estimulación, fertilización, inseminación y ejemplos de producción de mamíferos no humanos o de embriones mamíferos no humanos abordan la calidad del esperma, tal como una o más características de los espermatozoides, tales como viabilidad, movilidad, funcionalidad o tasas de fertilización consistentes con las divulgaciones de las solicitudes de patente y las referencias mencionadas anteriormente. Además, las características de los espermatozoides se pueden abordar dentro del contexto de diversas técnicas de recolección, manipulación, separación, almacenamiento, transporte, uso, fertilización o inseminación, y en esos u otros ejemplos diversos, dentro del contexto de ensayo, el análisis o la determinación de la atributos biológicos, químicos, físicos, fisiológicos o funcionales de los espermatozoides. Por lo tanto, los sistemas pueden proporcionar el procesamiento, la estimulación, la conservación, la fertilización y la inseminación de espermatozoides, por ejemplo, incorporando técnicas de clasificación de flujo, técnicas de separación de alta pureza, técnicas de fertilización e inseminación a dosis bajas, procedimientos de inseminación heteroespérmica, tales como evaluar la viabilidad, la movilidad, la función o la fertilidad comparativas procesadas en varios entornos de presión dentro de un clasificador, por citar solo algunos ejemplos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una muestra de esperma de mamífero no humano adecuada para la fertilización *in vitro*, que incluye la etapa de:
- 5 obtener espermatozoides; y caracterizado por que el procedimiento incluye además las etapas de:
- crioconservar los espermatozoides;
- 10 descongelar los espermatozoides;
- clasificar los espermatozoides;
- crioconservar los espermatozoides;
- 15 descongelar los espermatozoides dos veces crioconservados; y
- establecer una muestra de esperma a partir de los espermatozoides dos veces crioconservados; en el que la muestra de esperma está compuesta por una muestra seleccionada del grupo que consiste en una paja, un gránulo, una dosis de inseminación y una muestra de esperma preparada.
- 20
2. El procedimiento para producir una muestra de esperma de mamífero no humano adecuada para fertilización *in vitro* según la reivindicación 1, caracterizado por que la muestra de esperma es capaz de fecundar al menos un óvulo, *in vitro*.
- 25
3. El procedimiento para producir una muestra de esperma de mamífero no humano adecuada para fertilización *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los espermatozoides dos veces crioconservados son adecuados para producir al menos un animal de un sexo preseleccionado.
- 30
4. Un procedimiento para producir una muestra de esperma de mamífero no humano adecuada para inseminación artificial, que incluye la etapa de:
- obtener espermatozoides; y caracterizado por que el procedimiento incluye además las etapas de:
- 35 crioconservar los espermatozoides;
- descongelar los espermatozoides;
- clasificar los espermatozoides;
- 40 crioconservar los espermatozoides;
- descongelar los espermatozoides dos veces crioconservados; y
- 45 establecer una muestra de esperma a partir de los espermatozoides dos veces crioconservados; en el que la muestra de esperma está compuesta por una muestra seleccionada del grupo que consiste en una paja, un gránulo, una dosis de inseminación y una muestra de esperma preparada.
- 50
5. El procedimiento para producir una muestra de esperma de mamífero no humano según la reivindicación 4, caracterizado por que la muestra de esperma es adecuada para producir al menos un animal de un sexo preseleccionado.

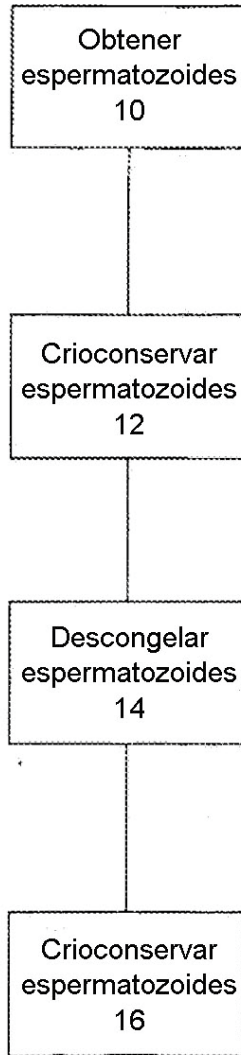


FIG. 1



FIG. 2

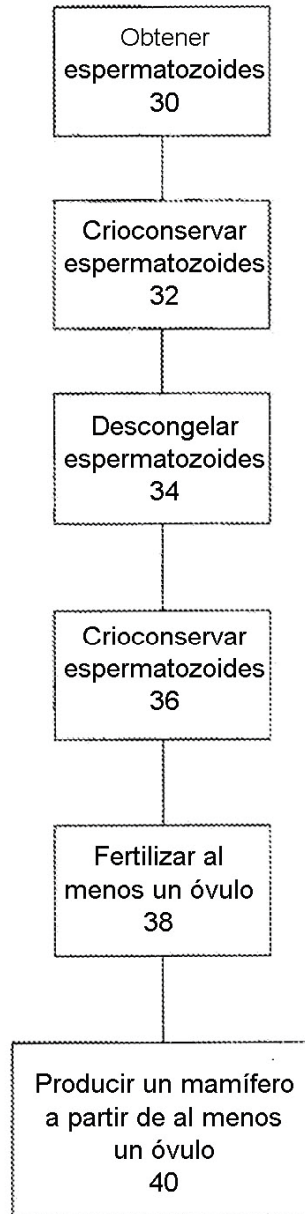


FIG. 3

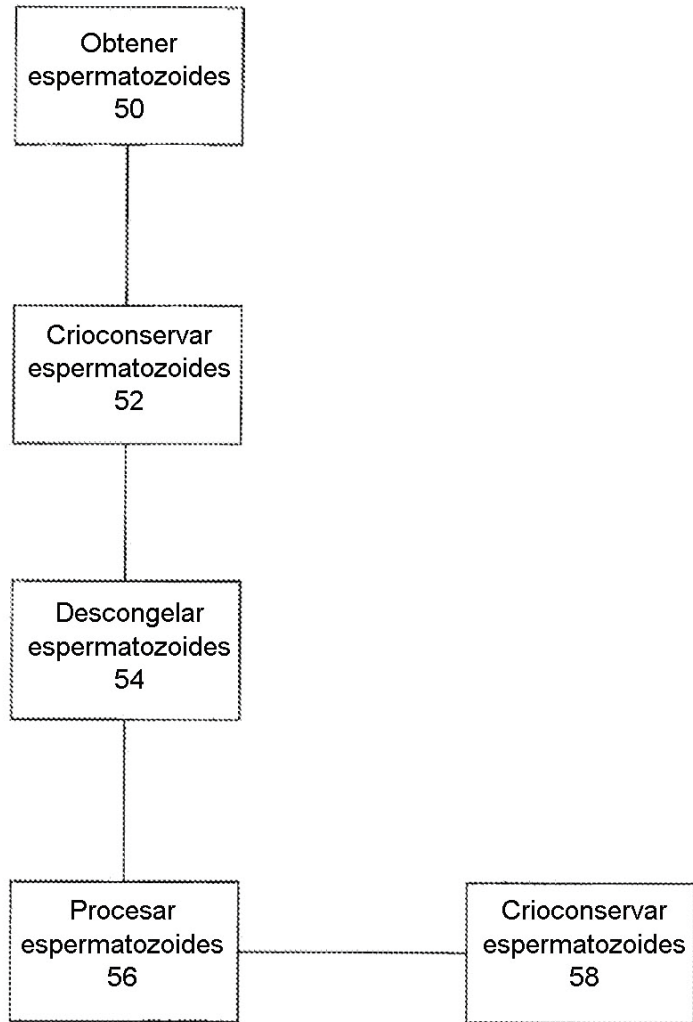


FIG. 4

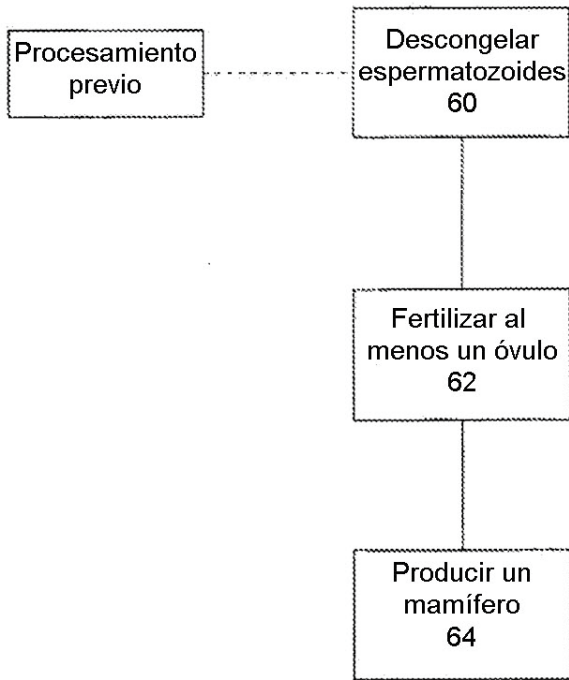


FIG. 5