



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0313163-7 B1

(22) Data do Depósito: 01/08/2003

(45) Data de Concessão: 17/11/2015
(RPI 2341)



(54) Título: SISTEMA DE SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS A BAIXA PRESSÃO

(51) Int.Cl.: A01N 1/02; G01N 1/30; G01N 33/48; C07K 1/00; A61B 17/43; A61D 7/00

(30) Prioridade Unionista: 01/08/2002 US 60/400,971

(73) Titular(es): XY, LLC

(72) Inventor(es): JOHN L. SCHENK, GEORGE E. SEIDEL, TAE KWANG SUH

RELATÓRIO DESCRITIVO

Patente de Invenção para: "SISTEMA DE SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS A BAIXA PRESSÃO".

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

5 Esta invenção refere-se a amostras de células espermáticas para inseminação, produzidas através da retenção em uma corrente de líquido que tem características de fluxo correspondentemente ajustáveis de forma seletiva, e métodos para avaliar comparativamente a fertilidade de células espermáticas para inseminação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A pré-seleção do sexo foi conseguida em muitas espécies de animais de criação após o desenvolvimento de métodos seguros e confiáveis para separar células espermáticas em populações enriquecidas portadoras do cromossoma X e portadoras do cromossoma Y. Vide, por exemplo, os métodos e aparelhos
15 descritos nos documentos n^{os} WO 00/06193; WO 02/043574; WO 01/85913; WO 99/33956; WO 01/40765; WO 98/34094; WO 99/42810; e WO 02/043486.

Um problema significativo com as células espermáticas selecionadas por sexo pode ser a separação das células espermáticas em quantidades suficientes para produzir amostras para inseminação selecionadas por sexo ou inseminados
20 selecionados por sexo que são viáveis ou suficientemente férteis para aplicação comercial por tecnologia convencional, o que tem provocado a necessidade de aumentar a pressão da corrente de líquido dos citômetros de fluxo ou dos instrumentos de seleção por fluxo até cerca de 0,345 MPa (50 lb/in²). Com relação às células espermáticas de muitas espécies de mamíferos, retidas em
25 correntes de líquido que têm características de fluxo resultantes dessa aplicação de pressão, a viabilidade, motilidade ou outras características de fertilidade podem ser alteradas.

Outro problema significativo com inseminados de células espermáticas selecionadas por sexo ou amostras de células espermáticas
30 selecionadas por sexo para inseminação pode ser a vasta diferença nas características de fertilidade das células espermáticas, que podem variar muito entre as amostras. Assim sendo, o sucesso da inseminação artificial realizada sob

condições substancialmente idênticas pode resultar em índices de prenhez correspondentemente diferentes.

5 Outro problema significativo com a tecnologia existente de seleção de células espermáticas por sexo pode ser a inexistência de um ensaio a partir do qual a fertilidade das células espermáticas pode ser comparada diretamente *in vivo* (como por exemplo, em conjunto com procedimentos de inseminação artificial) e *in vitro* (como por exemplo, em conjunto com procedimentos de IVF).

10 A presente invenção enfrenta a série de problemas associados a espermatozóides com fertilidade reduzida das células espermáticas, que foram separadas em populações enriquecidas portadoras do cromossoma X e portadoras do cromossoma Y, e a inexistência de ensaios heteroespermáticos para comparar a função e a fertilidade de células espermáticas separadas ou selecionadas, e particularmente, as células espermáticas selecionadas por fluxo.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

15 Conseqüentemente, o objetivo amplo da invenção fornece dispositivos e métodos para usar tais dispositivos, a fim de controlar as características de fertilidade de células espermáticas das células espermáticas isoladas a partir do sêmen obtido de um macho de uma espécie de mamífero, tais como a motilidade, viabilidade, índice de fertilização, taxa de clivagem, proporção
20 de blastocistos, ou similares.

Proporcionar fertilidade controlada de células espermáticas, de acordo com a invenção, pode ser conseguido com as células espermáticas obtidas de inúmeras e variadas espécies de mamíferos, incluindo sem limitações, uma espécie bovina de mamífero, uma espécie eqüina de mamífero, uma espécie ovina
25 de mamífero, uma espécie canina de mamífero, uma espécie felina de mamífero, uma espécie suína de mamífero, uma espécie marinha de mamífero, uma espécie cerval de mamífero, uma espécie primata de mamífero, uma espécie caprina de mamífero, ou uma espécie de mamífero listada por Wilson, D. E. e Reeder, D.M., "Mammal Species of the World", Smithsonian Institution Pres (1993), aqui
30 incorporado como referência.

Com relação a certas modalidades da invenção, a característica de fertilidade das células espermáticas compreende a seleção afirmativa de

características de fertilidade antes de isolar as células espermáticas do sêmen do macho da espécie de mamífero e a aplicação da invenção para alterar as características de fertilidade das células espermáticas, a fim de proporcionar as características de fertilizadades desejadas. Com relação a outras modalidades da invenção, as condições de tratamento das células espermáticas são selecionadas dentro de uma ampla gama de condições de tratamento de células espermáticas que podem ser usadas para tratar células espermáticas de uma espécie específica de mamífero para obter células espermáticas que têm características de fertilidade controladas. As características de fertilidade controladas podem compreender uma proporção desejada de células espermáticas móveis, acrossomas intactos, células espermáticas viáveis dentro de uma população de células espermáticas tratadas; ou podem compreender um índice de clivagem desejado de oócitos ou uma proporção de formação de blastocistos quando as células espermáticas tratadas são utilizadas para fertilizar oócitos *in vitro*; ou podem compreender um índice de prenhez ou proporção de sexo da progênie quando as células espermáticas tratadas são utilizadas para inseminação artificial. Com relação a certas modalidades da invenção, uma proporção maior de células espermáticas móveis, uma proporção maior de células espermáticas viáveis, uma proporção maior de acrossomas intactos, ou um número maior de células espermáticas férteis dentro de uma população de células espermáticas de células espermáticas tratadas, pode ser atingido, em comparação com o tratamento convencional da mesma população de células espermáticas. Certas modalidades da invenção possibilitam a obtenção de células espermáticas que têm características de fertilidade controladas que não são substancialmente diferentes das características de fertilidade de células espermáticas no sêmen recém-ejaculado, ou são substancialmente comparáveis a elas. Em outros casos, a aplicação de certas modalidades da invenção pode, caso desejado, resultar em células espermáticas que têm características de fertilidade controladas, que são substancialmente diferentes daquelas de células espermáticas de sêmen recém-ejaculado. Particularmente, certas modalidades da invenção podem ser usadas para obter células espermáticas bovinas que têm características de fertilidade controladas ou podem ser usadas para obter células espermáticas eqüinas que têm características

de fertilidade controladas, as quais, caso desejado, podem ser dotadas de características de fertilidade substancialmente comparáveis às características de fertilidade de célula espermáticas bovinas ou células espermáticas eqüinas dentro do sêmen bovino ou eqüino recém-ejaculado.

5 Outro objetivo amplo da invenção pode ser fornecer amostras de células espermáticas para inseminação, que têm características controladas de fertilidade das células espermáticas, e tais amostras de células espermáticas para inseminação podem ser configuradas, sem limitações, para inseminação artificial de uma fêmea de uma espécie de mamífero, fertilização de oócitos *in vitro*, ou
10 injeção intracitoplasmática de células espermáticas, ou similares.

 Outro objetivo amplo da invenção pode ser fornecer métodos para selecionar por sexo as células espermáticas que conseguem proporcionar controle afirmativo de características de fertilidade de células espermáticas, tais como motilidade, viabilidade, índice de fertilização, taxa de clivagem, proporção de
15 blastocistos, ou similares. Um aspecto deste objetivo amplo da invenção pode ser fornecer dispositivos de citometria de fluxo ou seleção de células, ou métodos de citometria de fluxo e seleção de células, que possibilitam o controle afirmativo das características de fertilidade de células espermáticas selecionadas por sexo.

 Outro objeto da invenção pode ser fornecer amostras de células
20 espermáticas bovinas para inseminação, que têm características de fertilidade controladas das células espermáticas, configuradas para inseminação artificial de uma fêmea de uma espécie bovina de mamífero, contendo entre cerca de 100.000 e cerca de 3.000.000 células espermáticas bovinas selecionadas por sexo, tendo características de fertilidade controladas das células espermáticas.

25 Outro objeto da invenção pode ser fornecer amostras de células espermáticas eqüinas para inseminação, que têm características de fertilidade controladas das células espermáticas, configuradas para inseminação artificial de uma fêmea de uma espécie eqüina de mamífero, contendo entre cerca de 5.000.000 e cerca de 50.000.000 de células espermáticas bovinas selecionadas por
30 sexo, tendo características de fertilidade controladas das células espermáticas.

 Outro objeto significativo da invenção pode ser fornecer dispositivos ou métodos para manter as características de fertilidade controladas de células

espermáticas das células espermáticas com relação ao processamento de células espermáticas, estocagem de células espermáticas, ou uso de células espermáticas, inclusive, porém sem limitações, inseminação de mamífero(s) fêmeo(s) ou fertilização de oócito(s).

5 Outro objeto significativo da invenção pode ser fornecer métodos para inseminar artificialmente fêmeas de uma espécie de mamífero com amostras de células espermáticas para inseminação, que têm características de fertilidade controladas das células espermáticas. Com relação a certas modalidades da invenção, fornece-se métodos de inseminação com um número baixo ou reduzido
10 de células espermáticas que têm características de fertilidade controladas, comparado com o número usual ou típico de células espermáticas usado em tais procedimentos de inseminação artificial, estejam ou não tais células espermáticas separadas em populações enriquecidas portadoras do cromossoma X ou portadoras do cromossoma Y.

15 Outro objeto amplo da invenção pode ser fornecer um método para avaliar a fertilidade comparativa de populações de células espermáticas. Certas modalidades da invenção fornecem um método para avaliar a fertilidade comparativa de células espermáticas de diferentes machos de uma espécie de mamífero, quando as células espermáticas de cada macho são expostas a um
20 tratamento citométrico de fluxo substancialmente igual. Outras modalidades da invenção fornecem um método para avaliar a fertilidade comparativa de células espermáticas do mesmo macho de uma espécie de mamífero, que foram expostas a tratamentos citométricos de fluxo diferentes. Certas modalidades da invenção fornecem métodos para indicar a fertilidade comparativa de células espermáticas
25 que têm características de fertilidade controladas.

Naturalmente, outros objetivos significativos da invenção podem se tornar evidentes na descrição precedente da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

30 A Figura 1 é um diagrama esquemático de um sistema selecionador de acordo com uma técnica de separação com citômetro de fluxo para a presente invenção.

A Figura 2 é um diagrama das células retidas na área de queda livre de um citômetro de fluxo típico.

MODO(S) PARA CONDUZIR A INVENÇÃO

5 A invenção é um sistema de processamento de sêmen ou células espermáticas para manter, intensificar, avaliar, testar ou determinar os atributos biológicos, químicos, físicos, fisiológicos ou funcionais de células espermáticas dentro do contexto de vários procedimentos de coleta, manuseio, estocagem, transporte, separação ou inseminação.

10 Uma modalidade da invenção pode compreender a obtenção de células espermáticas de uma espécie de mamífero, como definido genericamente acima. As células espermáticas podem ser então retidas em uma corrente de fluido que tem características de fluxo. A corrente de líquido dentro de um conduto tem características de fluxo influenciadas pelas propriedades reológicas da corrente de líquido, pela configuração ou arranjos do conduto no qual a
15 corrente de líquido escoar, bem como pelas forças externas aplicadas à corrente de líquido, tal como a pressão hidrostática, vibrações oscilatórias, vibrações piezoelétricas, oscilações térmicas, ou similares.

É importante que estas características de fluxo da corrente de líquido contribuam para a quantidade de pressão necessária para mover o líquido dentro
20 do conduto. Como um exemplo não limitativo, na citometria de fluxo o líquido se move dentro de uma área relativamente grande da seção transversal e depois dentro de uma área relativamente pequena da seção transversal depois de uma interface de análise até um ponto final de coleta.

Este tipo de configuração ou arranjo, junto com as propriedades
25 reológicas da corrente de líquido, pode criar forças localizadas, tais como forças de compressão, forças de cisalhamento, ou similares, que podem ter influência sobre a integridade física de partículas tais como as células espermáticas retidas na corrente de líquido.

Com relação às modalidades da invenção que incluem componentes
30 ou etapas que envolvem citometria de fluxo ou seleção de células como um meio para analisar, separar baseado em uma característica da célula espermática, selecionar por sexo, ou processar de outra forma as células espermáticas, um

citômetro de fluxo ou instrumento de seleção de células, conceitual, não limitativo, está ilustrado na Figura 1.

Um citômetro de fluxo ou instrumento de seleção de células inclui todos os componentes, ou parte deles, ilustrados na Figura 1, que incluem sem
5 limitações uma fonte de células espermáticas (1) que atua para estabelecer ou suprir células espermáticas para analisar, separar, controlar as características de fertilidade, ou para tratar de outra forma.

As células espermáticas são depositadas dentro de um bico injetor (2) de uma maneira tal que as células espermáticas fiquem circundadas por um
10 líquido prepucial (3). Qualquer líquido prepucial compatível com o citômetro de fluxo ou instrumento de seleção por fluxo e que proporcione um ambiente aceitável para as células espermáticas durante a análise de fluxo ou processamento pode ser utilizado com a invenção, inclusive, porém sem limitações, líquidos prepuciais que contêm, individualmente ou em várias combinações, uma solução
15 salina tamponada com fosfato, uma solução de citrato (tal como uma solução de citrato de sódio a 2,9%) ou uma solução tamponada com HEPES.

O líquido prepucial (3) é usualmente alimentado por alguma fonte (4) de líquido prepucial, de tal modo que, conforme a fonte (1) de células espermáticas supre as células espermáticas, o líquido prepucial (3) é alimentado
20 concomitantemente através do bico injetor (2). Desta maneira, o líquido prepucial (3) forma um ambiente de líquido prepucial para as células. Como os vários líquidos são fornecidos para o citômetro de fluxo sob alguma pressão, eles escoam para fora do bico injetor (2) e no orifício (5) do bico injetor.

Instalando algum tipo de oscilador (6), que pode ser controlado
25 muito precisamente através de um controle (7) do oscilador, ondas de pressão podem ser estabelecidas dentro do bico injetor (2) e transmitidas para o líquido prepucial que sai pelo bico injetor (2) no orifício (5) do bico injetor. Como o oscilador (6) atua assim sobre o líquido prepucial (3), a corrente (8) que sai pelo orifício (5) do bico injetor eventualmente e regularmente forma gotículas (9).
30 Devido ao fato de que as células estão circundadas por um ambiente de líquido prepucial, as gotículas (9) podem conter dentro delas células espermáticas individualmente isoladas (10).

Como as gotículas (9) contêm genericamente células espermáticas isoladas (9), o citômetro de fluxo ou instrumento de seleção de células pode distinguir entre e separar gotículas baseado em uma ou mais características de células espermáticas da célula espermática contida dentro de uma gotícula (9).

5 Isso é realizado através de um sistema de leitura (11) de células espermáticas. O sistema de leitura de células espermáticas envolve pelo menos algum tipo de detector (12) que responde às células espermáticas contidas dentro de cada gotícula (9).

Um tipo de sistema de leitura (11) de células espermáticas está
10 discutido exaustivamente na patente nº US 5.135.759, expedida para Johnson, que é aqui incorporada como referência. Como a patente de Johnson explica para células espermáticas, o sistema de leitura de células (11) pode causar uma ação que depende da presença relativa ou ausência relativa de um corante específico que pode ser excitado por algum estimulante, tal como o feixe de um laser (13).
15 Embora cada tipo de célula espermática possa ser corado com um corante, o comprimento diferente cromossoma X e do cromossoma Y causa diferentes níveis de coloração. Assim sendo, ao ler o grau de corante presente em cada célula espermática, é possível discriminar entre espermatozoides portadores do cromossoma X e espermatozoides portadores do cromossoma Y pelos seus níveis de emissão diferentes.
20 Conhecem-se sistemas ópticos de detecção e análise de células espermáticas alternativos que também podem ser usados de acordo com a invenção e pretende-se que a descrição fornecida na patente de Johnson seja com propósito ilustrativo, de tal modo que os inúmeros e variados usos da invenção possam ser entendidos. Vide também o documento nº WO 01/85913 que é aqui incorporado como
25 referência.

Para conseguir a separação final e o isolamento das células apropriadas em uma técnica de separação com citômetro de fluxo ou instrumento de seleção de células, os sinais recebidos pelo sensor (12) são alimentados para algum tipo de sistema de discriminação seletor (14) que toma muito
30 rapidamente a decisão e pode carregar diferencialmente cada gotícula (9), baseado em se a célula desejada existe ou não dentro dessa gotícula (9). Desta maneira, o sistema de discriminação seletor (14) atua para permitir que as placas de

deflexão eletrostática (15) deflita gotículas (9), baseado em se elas contêm ou não a célula espermática que tem certas características de célula espermática. Como resultado, o citômetro de fluxo ou instrumento selecionador de células atua para separar as células fazendo com que elas pousem em um ou mais recipientes de coleta (16). Assim sendo, lendo alguma propriedade das células espermáticas, o citômetro de fluxo ou instrumento selecionador de células pode discriminar entre células baseado em uma característica específica e colocá-las no recipiente de coleta (16) apropriado. Em certos citômetros de fluxo ou instrumentos selecionadores de células, as gotículas de esperma portadoras de X têm carga positiva, e assim sendo, defletem em uma direção, as gotículas de esperma portadoras de Y têm carga negativa, e assim sendo, defletem para outra direção, e a corrente rejeitada (isto é, células não selecionáveis) não tem carga, e assim sendo, é coletada em uma corrente não defletida para dentro de um tubo de sucção ou contentor similar.

Fazendo agora referência principalmente à Figura 2, o processo pode ser compreendido ainda mais. Como ilustrado nesta figura, o bico injetor (2) emite uma corrente (8) que, por causa do oscilador (7) (não ilustrado na Figura 2), forma gotículas (9). Como a fonte de células (1) (não ilustrada na Figura 2) pode suprir células espermáticas (10) que, como descrito por Johnson, podem estar coradas (ou em certas modalidades da invenção, não coradas, quando se usa tecnologia DIC), a emissão de luz gerada pelo feixe gerado por laser (ou fonte de iluminação quando a tecnologia DIC é utilizada) (13) incidente sobre o corante (a cabeça do espermatozóide quando a tecnologia DIC é utilizada) é determinada diferencialmente pelo sensor (12), de tal modo que a existência ou inexistência de uma carga em cada gotícula (9) conforme ela se separa da corrente (8) possa ser controlada pelo citômetro de fluxo. Este controle resulta em gotículas (9) carregadas positivamente, carregadas negativamente, e não carregadas, baseado no seu conteúdo. Como ilustrado na Figura 2, certas gotículas estão ilustradas como gotículas defletidas (17). Estas gotículas defletidas (17) são as que contêm células espermáticas (10) que podem ser de um sexo ou do outro. Elas são então depositadas no coletor apropriado (16), gerando desta forma uma população de células espermáticas selecionadas por sexo.

Caso a corrente de líquido ocorra dentro do contexto de um citômetro de fluxo, selecionador de células, ou outro dispositivo que retém células espermáticas dentro de uma corrente de líquido, as características de fluxo da corrente podem ser caracterizadas, e um meio de ajuste para alterar as características de fluxo da corrente de líquido pode ser introduzido para aumentar ou diminuir as forças tais como forças de compressão, forças de cisalhamento, ou similares, de tal modo que as partículas retidas na corrente de líquido possam ser fisicamente, fisiologicamente, funcionalmente ou mecanicamente alteradas.

Assim sendo, uma faixa seletivamente ajustável de características da corrente de líquido para um trajeto do fluxo pode ser gerada usando o meio de ajuste e pode ser expressa como uma medida incremental. Por exemplo, a alteração das características da corrente de líquido dentro de um contexto de citômetro de fluxo ou instrumento selecionador de células pode ser ajustada incrementalmente e medida em unidade de pressão e tipicamente permite um aumento ou decréscimo incremental na pressão da corrente de líquido entre cerca de 0,138 Mpa (20 lb/in²) e 0,690 Mpa (100 lb/in²) com um aumento ou decréscimo correspondente na velocidade da corrente de líquido ou do líquido prepucial.

De acordo com certas modalidades da invenção, as células espermáticas de uma espécie específica de mamífero ficam retidas em uma corrente de líquido que tem características de fluxo da corrente de líquido ajustáveis. As características de fluxo da corrente de líquido são então ajustadas seletivamente em uma faixa medida incrementalmente na qual as células espermáticas retidas permanecem viáveis. As características de fertilidade das células espermáticas são então avaliadas para cada uma de uma pluralidade de amostras de células espermáticas tomadas em correspondência a cada uma de uma pluralidade de características de fluxo geradas dentro da faixa medida.

Subseqüentemente, as características de fertilidade das células espermáticas com relação às células espermáticas de uma espécie de mamífero ou de membros individuais de uma espécie de mamífero podem ser controladas e podem ser geradas amostras de células espermáticas para inseminação, que têm as características de fertilidade desejadas de células espermáticas.

Por exemplo, as células espermáticas de cada um de seis touros reprodutores foram coradas com Hoechst 33342 125 μm por 45 min a 34°C, e selecionadas em massa (passadas através de um citômetro de fluxo ou instrumento selecionador de células sem selecionar em subpopulações), ou selecionadas com um citômetro de fluxo que tem um bico injetor com u diâmetro interno de 70 μm em populações portadoras do cromossoma X ou portadoras do cromossoma Y (ou ambas) com cerca de 95% de precisão, a corrente de líquido tendo uma pressão de 0,207 MPa (30 lb/in²), 0,276 Mpa (40 lb/in²) ou 0,345 MPa (50 lb/in²). Baixar a pressão da corrente de líquido de 0,345 Mpa (50 lb/in²) para 0,207 MPa (30 lb/in²) reduziu a taxa de seleção em somente 2 a 3%.

As células espermáticas foram subsequêntemente resfriadas até 5°C e concentradas por centrifugação, carregadas em bisnagas de 0,25 mL com cerca de 2×10^6 células espermáticas totais por coluna de 100 μL , e congeladas usando um método de congelamento a vapor, junto com controles não selecionados. As células espermáticas nas bisnagas foram subsequêntemente descongeladas.

As células espermáticas foram então avaliadas com relação a várias características de fertilidade de células espermáticas de maneira cega por dois observadores em 30 e 120 min após o descongelamento quanto à motilidade progressiva, bem como por citometria de fluxo 105 min após o descongelamento, quanto à porcentagem de células espermáticas vivas com corante PI, e por análise CASA 120 min após o descongelamento, usando o sistema Hamilton Thorne. O procedimento inteiro foi replicado duas vezes.

O fatorial ANOVA indicou que os efeitos touro e pressão foram significantes ($P < 0,005$, Tabela 1).

Tabela 1

Respostas de Espermatozóides Após Descongelamento a Diferentes Pressões do Sistema Durante a Seleção^a

Resposta	Pressão, MPa (psi)			
	0,345 (50)	0,276 (40)	0,207 (30)	Controle Não- Selecionado

Motilidade após 30 min (%)	44,7	48,6	49,6	52,1
Motilidade após 120 min (%)	34,5	40,8	42,7	40,8
Espermatozóides vivos (%)	51,7	55,7	57,8	58,5
Motilidade total CASA (%)	25,1	37,2	40,9	34,8
ALH* CASA	6,0	7,6	7,8	8,8

^aTodos estatisticamente significantes ($P < 0,005$)

*Amplitude do deslocamento lateral da cabeça

Números mais altos significam motilidade menos rija e mais normal. Houve diferenças típicas entre touros em todas as respostas. Entretanto, as interações de touro por tratamento foram pequenas com uma exceção, significando que as descobertas se aplicam similarmente à maioria dos touros na população. As características de fluxo da corrente de líquido ajustadas incrementalmente para aumentar a pressão afetaram substancialmente todas as características de fertilidade medidas das células espermáticas; entretanto, somente as altamente significantes em termos estatísticos estão na Tabela 1.

Como pode ser entendido, houve mudança significativa nas características de fertilidade das células espermáticas entre as amostras de células espermáticas tomadas a uma pressão de cerca de 0,345 MPa (50 lb/in²) e cerca de 0,276 Mpa (40 lb/in²), e depois uma mudança muito menor entre cerca de 0,276 Mpa (40 lb/in²) e cerca de 0,207 MPa (30 lb/in²), indicando que o efeito sobre as características de fertilidade das células espermáticas não pode ser presumido como linear. Para células espermáticas bovinas expostas às características de fluxo descritas a 0,207 MPa (30 lb/in²), as características de fluxo das células espermáticas foram substancialmente iguais àquelas dos controles não selecionados ou comparáveis aos controles não selecionados, e para algumas respostas, melhores, caso as células espermáticas venham a ser usadas para inseminação ou inseminação artificial de fêmeas da espécie bovina. Procedimentos similares foram conduzidos com células espermáticas obtidas de

As características de fertilidade de células espermáticas podem ser controladas com relação a células espermáticas obtidas de mamíferos. Para a maioria das espécies de mamíferos, alterar as características da corrente de líquido para reduzir incrementalmente a pressão da corrente de líquido, seja no contexto

de citometria ou de outra forma, pode resultar em uma série escalonada de amostras de células espermáticas correspondentes que têm características de fertilidade alteradas das células espermáticas, que podem ser usadas para uma série de procedimentos, inclusive inseminação artificial, fertilização *in vitro*, ou
 5 injeção intracitoplasmática, como descrito acima.

A invenção fornece testes alternativos para avaliar respostas binomiais tais como prenhe/não-prenhe, que tipicamente requerem grandes números de animais por tratamento para obter significância estatística, a menos que as diferenças de tratamento sejam razoavelmente grandes. Uma modalidade
 10 da invenção, que consegue ampliar as diferenças em características de fertilidade de células espermáticas de esperma selecionado por sexo, devido a diferenças de tratamento, compreende a fertilização competitiva ou heterospérmica, misturar espermatozoides de tratamentos ou machos diferentes antes da inseminação, e determinar a proporção de embriões, fetos ou filhotes derivados de cada macho ou
 15 tratamento.

Por exemplo, a fertilidade após a seleção por sexo de células espermáticas por citometria de fluxo ou por seleção de células pelo teor do DNA em duas pressões diferentes de corrente de líquido pode ser avaliada usando inseminação heterospérmica e sexo como marcador genético. As células
 20 espermáticas de cada um de dois touros foram selecionadas em populações portadoras do cromossoma X ou cromossoma Y, ou ambos, com 95% de precisão, sendo a pressão da corrente de líquido ajustada para de 0,207 MPa (30 lb/in²) ou 0,345 MPa (50 lb/in²). Depois de concentrar as células espermáticas após a seleção por centrifugação, 1×10^6 células espermáticas portadoras do cromossoma
 25 X selecionadas a 0,207 MPa (30 lb/in²) foram colocadas em bisnagas de 0,25 mL com 1×10^6 células espermáticas portadoras do cromossoma Y selecionadas a 0,345 MPa (50 lb/in²) para cada touro, bem como o inverso em outras bisnagas: 1×10^6 espermatozoides Y a 0,207 MPa (30 lb/in²) mais 1×10^6 espermatozoides X a 0,345 MPa (50 lb/in²). Estas células espermáticas, junto com controles não
 30 selecionados, foram então congeladas, descongeladas depois de alguns meses, e inseminadas no corpo do útero de 85 novilhas Holstein, 12 ou 24 h depois que se observou o estro com subgrupos equilibrados por dois inseminadores.

Dois meses após a inseminação, 81% das 43 novilhas que ficaram prenhes tiveram fetos do sexo (determinado por ultra-som) correspondente ao sexo dos espermatozóides processados a 0,207 MPa (30 lb/in²). Isto diferiu da razão de sexo 50:50 esperada ($P < 0,01$), caso não houvesse diferença nas características de fertilidade dos espermatozóides selecionados nas duas pressões. O índice de prenhez com espermatozóide selecionado por sexo a 2×10^6 espermatozóides por dose foi de 51% (43/85); isto foi similar aos controles de 20×10^6 espermatozóides não sexados por dose dos mesmo ejaculados, 39% (9/23).

Outra modalidade da invenção fornece um método para alterar a taxa de clivagem e a proporção da formação de blastocistos, usando células espermáticas que têm características de fertilidade controladas das células espermáticas. Duas amostras de células espermáticas bovinas, cada uma tendo características de fertilidade controladas, foram geradas selecionando por fluxo células espermáticas bovinas a 0,276 Mpa (40 lb/in²) e 0,345 MPa (50 lb/in²), respectivamente. A resposta à dose da concentração de células espermáticas no meio de fertilização foi conduzida com células espermáticas portadoras do cromossoma X e células espermáticas portadoras do cromossoma Y de cada amostra de células espermáticas. Assim sendo, foi conduzido um procedimento multifatorial compreendendo 2 pressões de corrente de líquido, 3 concentrações de células espermáticas ($1, 0,33$ e $0,11 \times 10^6$ espermatozóides/mL), 6 touros e 2 sexos.

Cerca de 2.000 oócitos foram aspirados a partir de folículos de cerca de 2 mm a cerca de 8 mm dos ovários do matadouro. Meios quimicamente definidos (CDM) foram usados no procedimento inteiro, como descrito em *Journal of Animal Sciences* 78:152-157 (2000), aqui incorporado como referência. A maturação ocorreu em M-CDM suplementado com 0,5% de FAB-BSA, 15 ng/mL de NIDDK-oFSH-20, 1 µg/mL de USDA-LH-B-5, 0,1 µg/mL de E₂, 50 ng/µL de EGF e 0,1 mM de cisteína por 23 h a 38,8 °C e 5% de CO₂ em ar. As células espermáticas selecionadas, congeladas com 2×10^6 células por bisnaga, foram descongeladas e centrifugadas a 400 x g através de gradientes de 2 mL a 45% e 2 mL a 90% de Percoll. Depois, o sobrenadante foi descartado e

adicionou-se 2 mL de FCDM suplementado com 0,5% de FAB-BSA, 2 mM de cafeína e 0,02% de heparina ao agregado espermático e centrifugou-se a 500 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, deixando aproximadamente 50 µL de suspensão espermática. Os oócitos maduros foram lavados uma vez em FCDM e transferidos em grupos de 15 em 5 µL para dentro de gotas de FCDM de 25 µL sob óleo mineral. A fertilização ocorreu adicionando 10 µL da suspensão espermática por gota por 18 h a 38,8°C, 5% de CO₂ em ar. Os zigotos presumíveis foram cultivados em CDM1 por 2 dias e CDM2 por 4,5 dias a 38,5°C, 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂. No dia 7,5, o desenvolvimento de blastocistos foi avaliado: Qualidade 1 a 4 (1 sendo excelente e 4 sendo deficiente) e estágio de desenvolvimento 6 a 8 (6 = blastocistos completos, 6,5 = blastocistos em expansão, 7 = blastocistos expandidos, 7,5 = blastocistos em processo de *hatching*, e 8 = blastocistos *hatched*). Os dados (Tabela 1) foram analisados por ANOVA e primeiro desvio após a transformação do seno inverso.

As taxas de clivagem (53,6 e 43,6%) e de blastocistos (18,2 e 14,7%) foram mais altas para procedimentos que utilizam células espermáticas que têm características controladas das células espermáticas obtidas a cerca de 0,276 Mpa (40 lb/in²) do que a 0,345 MPa (50 lb/in²) ($P < 0,01$). Não houve qualquer interação entre dose e pressão; portanto, houve uma vantagem similar à pressão mais baixa em cada concentração espermática. Uma clara resposta à dose da concentração de células espermáticas para clivagem e produção de blastocistos foi encontrada (Tabela 2). Além disso, houve grandes diferenças entre touros ($P < 0,01$) para ambas respostas, e houve uma interação touro x dose ($P < 0,01$) para porcentagem de clivadas. Os dados indicam que a dose de espermatozóides deve ser $> 1,0 \times 10^6/\text{mL}$ para alguns touros. A qualidade dos embriões foi mais alta ($P < 0,01$) para espermatozóide Y do que para espermatozóide X (1,12 versus 1,57). Outros pesquisadores notaram isto no caso de embriões IVF quando os embriões era sexuais, e este efeito é agora confirmado com espermatozóide sexual.

Tabela 2

Dados de Clivagem (% C) e Blastocistos (% B) por Oócito Apresentados por Touro

	Touro
--	-------

	H023		H024		H025		H026		H027		H028		Média	
Concentração Esparmática (10 ⁶)	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B
0,11	18	1	6	1	4	11	36	15	20	7	54	15	30 ^a	8 ^a
0,33	44	4	7	2	72	31	62	21	29	11	68	18	47 ^b	14 ^b
1,0	56	18	35	14	85	43	83	34	72	27	85	29	69 ^c	28 ^c

^{a,b,c}Valores sem sobrescritos comuns dentro de grupos diferem, $P < 0,01$

^{**} A fertilidade do esperma selecionado foi baixa, em comparação com o esperma do controle não selecionado, devido em parte ao dano mecânico durante a seleção do esperma por citometria de fluxo. Baixar a pressão do sistema melhorou a

5 qualidade e também a fertilidade do esperma em IVF. O presente estudo avaliou o efeito da pressão do sistema durante a seleção do esperma e a maturação estendida de oócitos sobre o desenvolvimento de embriões após ICSI. O esperma de cada um de 3 touros foi corado com Hoechst 33342 125 μ M por 45 min a 34°C, selecionado em populações portadoras do cromossoma X e Y com 95% de

10 precisão, com a pressão dos selecionadores SX MoFlo[®] a 0,276 Mpa (40 lb/in²) ou 0,345 MPa (50 lb/in²), e depois crioconservado. Cinquenta oócitos bovinos obtidos dos ovários de matadouro foram colocados por poço com 1 mL de CDM1 suplementado com 0,5% de FAF-BSA, glicose 2 mM, 50 ng/mL de EGF, 15 ng/mL de NIDDK-oFSH-20, 1 μ g/mL de USDA-LH-B-5, 1 μ g/mL de E₂ e

15 cisteamina 0,1 mM, e depois maturados por 24 h ou 30 h a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar. Os cúmulos celulares de oócitos maduros foram removidos por turbilhonamento, e os oócitos com um corpo polar foram selecionados. Os espermatozóides móveis do sêmen selecionado congelado/descongelado foram recuperados por centrifugação através de 2 mL de Percoll a 45% e 2 mL de

20 Percoll a 90%, e a concentração foi ajustada para 4×10^6 /mL. Os oócitos maduros foram divididos em dois grupos para injeção, ICSI e injeção simulada, usando um sistema de piezoinjeção. O diâmetro externo da pipeta de injeção de esperma era de 8-10 μ m. Todas as manipulações foram realizadas à temperatura ambiente (24-25°C). Depois da injeção, os oócitos foram ativados com ionomicina 5 μ M por 4

25 min, cultivados em 50 μ L de CDM1 a 38,5°C sob 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, e avaliados quanto à clivagem 72 h após a injeção. Os oócitos não clivados dos grupos de ICSI e injeção simulada foram corados com orceína e avaliados quanto ao estado de fertilização. Os embriões clivados foram cultivados

adicionalmente e o desenvolvimento de blastocistos foi avaliado no dia 7,5 após a injeção. Os dados foram submetidos a ANOVA; a transformação do seno inverso foi usada para obter os dados em porcentagens.

Com oócitos amadurecidos em 24 h, não houve quaisquer diferenças
 5 (P < 0,1) entre esperma selecionado a 0,276 Mpa (40 lb/in²) versus 0,345 MPa (50 lb/in²) para clivagem ou taxas de blastocistos, nem houve interação de pressão x touro. Houve efeitos significativos de touros para todas as respostas estudadas (P < 0,05). Quando injetados com esperma selecionado a 0,276 Mpa (40 lb/in²), os oócitos amadurecidos por 30 h resultaram em uma taxa de clivagem mais alta do
 10 que os oócitos amadurecidos por 24 h (22,9 versus 12,2%, P < 0,05), com nenhuma diferença (P < 0,1) na taxa de blastocistos. O desenvolvimento global dos blastocistos foi mais alto em ICSI do que em injeções simuladas (7,5 versus 1,3%, P < 0,05). Quando oócitos não clivados com maturação de 24 h foram avaliados quanto ao estado de fertilização, ICSI apresentou porcentagem mais alta
 15 com 2 corpos bipolares e/ou espermatozóides descondensados, comparado com injeção simulada (15,7 versus 1,7%, P < 0,05). Com oócitos maturados em 30 h, não houve qualquer diferença no estado de fertilização entre esses dois grupos. Concluiu-se que não houve qualquer diferença na clivagem ou desenvolvimento para oócitos após injeção, usando espermatozóide móbil que tinha sido
 20 selecionado a 0,276 Mpa (40 lb/in²) versus 0,345 MPa (50 lb/in²) (P < 0,01).

Em outra modalidade da invenção, a inseminação heteroespérmica, usando sexo como marcador genético, pode ser usada para ranquear a fertilidade de machos e para ranquear a fertilidade de tratamentos com esperma que não envolvem sexagem de espermatozóides. Os atuais testes *in vitro* de função
 25 espermática não estão altamente correlacionados com fertilidade de machos, e as inseminações homospérmicas requerem centenas de inseminações por tratamento para obter dados precisos de fertilidade. A inseminação heteroespérmica, misturando o esperma de dois ou mais machos, fornece uma estimativa precisa da fertilidade relativa na maioria das espécies examinadas.

30 O esperma congelado, selecionado por fluxo, de 4 grupos de 4 touros foram descongelados e inseminados em novilhas 12 h ou 24 h após o início do estro em todas as combinações de 3 touros dentro dos grupos (ABC, ABD, ACD,

BCD). Números iguais de espermatozóides progressivamente móveis foram inseminados de cada touro, totalizando 600.000 espermatozóides móveis após descongelamento. Metade de cada inseminado foi depositada dentro de cada chifre uterino. Os embriões foram coletados de forma não cirúrgica 14,5 a 20 dias após o estro. As coleções produziram 165 embriões em alongamento de 332 novilhas (48%). Usou-se marcadores de DNA polimórficos para a genotipagem dos embriões, a fim de determinar o progenitor de cada biópsia de embrião. Depois da genotipagem, 118 dos 165 embriões puderam ser designados a um progenitor específico. Os índices heterospérmicos para ranquear cada grupo de touros foram calculados usando o teorema da análise de possibilidade máxima. Cada touro dentro dos grupos foi ranqueado baseado nesses índices (Tabela 1). No grupo 1, a fertilidade do pior touro foi significativamente mais baixa ($P < 0,05$) do que a de dois outros touros. No grupo 2, o touro dominante tinha o índice mais alto ($P < 0,05$). Distinções similares puderam ser feitas nos grupos 3 e 4. Entretanto, em três dos grupos a fertilidade de alguns touros não foi claramente alta ou baixa ($P > 0,05$).

Tabela 1

Índices Heterospérmicos \pm Erro Padrão para Touros Individuais dentro de Grupos

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
$1,47 \pm 0,41^a$	$2,43 \pm 0,43^a$	$1,68 \pm 0,44^a$	$0,92 \pm 0,36^{a,b}$
$0,44 \pm 0,27^{a,b}$	$0,22 \pm 0,15^b$	$1,09 \pm 0,39^{a,b}$	$0,46 \pm 0,20^a$
$1,84 \pm 0,46^a$	$0,90 \pm 0,35^b$	$0,83 \pm 0,31^{a,b}$	$2,02 \pm 0,40^b$
$0,25 \pm 0,17^b$	$0,45 \pm 0,23^b$	$0,40 \pm 0,22^b$	$0,59 \pm 0,24^a$

^{a,b} Índices sem sobrescritos comuns diferem, $P < 0,05$

Com estes procedimentos, uma média de 30 embriões genotipados por grupo de 4 touros permitiu a detecção de touros com fertilidade claramente diferente. Os tratamentos de espermatozóides também puderam ser avaliados com esta técnica. Este teste *in vitro*, que requer poucas fêmeas, fornece rapidamente informações referentes a quais touros têm fertilidade relativamente alta ou baixa.

A população de bezerros obtida por inseminação artificial de fêmeas com células espermáticas selecionadas por sexo, de acordo com a invenção, é

virtualmente idêntica aos controles que usam células espermáticas não selecionadas por sexo. Além disso, a inseminação artificial de fêmeas com espermatozóides selecionados por sexo resultou em aproximadamente 90% dos bezerros do sexo planejado. Como descrito acima, as células espermáticas podem
 5 ser selecionadas por sexo baseado no teor do DNA por citometria de fluxo ou por seleção de células após corar com Hoechst 33342. As células espermáticas selecionadas por sexo podem ser então crioconservadas como descrito em *Theriogenology* 52:1375 (.....), que é aqui incorporado como referência.

O estro pode ser sincronizado em novilhas e vacas de várias raças de abate e leiteiras, fornecendo na ração 0,5 mg de acetato de melengestrol (MGA)
 10 diariamente por 14 dias, e em seguida injeção intramuscular de 25 mg de prostaglandina $F_{0,2}$ ($PGF_{0,2}$) 17 a 10 dias depois, ou injeção intramuscular de 25 mg de $PGF_{0,2}$ em intervalos de 12 dias. A inseminação com amostras de inseminação selecionadas por sexo, congeladas/descongeladas, ou esperma
 15 congelado/descongelado do mesmo ejaculado, foi realizada 12 horas ou 24 horas após a observação inicial do estro. Para cada grupo de criação, cerca de 2/3 das inseminações foram com espermatozóides sexuais, enquanto que o esperma do controle foi usado no restante. A prenhez e o sexo fetal foram diagnosticados por ultra-som 2 meses depois.

O gado foi manejado em 13 fazendas através de parição e desmame sob diferentes níveis de manejo (N = 49 a 228 por fazenda). Os dados coletados incluíram duração da gestação, peso no nascimento, facilidade da parição (1 = normal até 4 = cesariana), peso no desmame, mortes neonatais, e mortes desde o nascimento até o desmame. Nem todas as fazendas registraram os pesos no
 25 nascimento e desmame. Os dados foram submetidos à análise fatorial de variância com fatores: grupos de manejo, esperma selecionado versus controle, e sexo dos bezerros. Usou-se transformação de seno invertido para obter os dados percentuais. As médias mínimas quadradas estão na Tabela 1.

Tabela 1

Resultados da Parição a partir de Bezerros Sexuais e do Controle

Tratamento	N	Duração da Gestação(d)	Morte Neonatal	Facilidade da Parição	Peso no Nascimento(kg)	Vivos no Desmame(%)	Peso no Desmame(kg)
------------	---	------------------------	----------------	-----------------------	------------------------	---------------------	---------------------

			(%)				
Sexuado ^a	574	279	3,9	1,31	34,3	92,0	239
Controle	385	279	5,9	1,30	34,1	88,9	239

^aNenhuma diferença significativa ($P > 0,1$) para qualquer resposta

Não houve quaisquer diferenças ($P > 0,1$) entre bezerros dos grupos sexuados e do controle para qualquer resposta estudada, nem existiram interações significantes. Houve efeitos significantes de grupos de manejo para todas as respostas estudadas ($P < 0,001$ para todos, exceto % de vivos no desmame, $P < 0,02$). Além disso, houve diferenças significantes (todas $P < 0,001$) entre bezerros fêmeos e machos quanto ao peso no nascimento: 32,2 e 35,5 kg; peso no desmame: 232 e 246 kg; dificuldade de parição: 1,20 e 1,42; e duração da gestação: 278 e 280 d.

A proporção de sexos dos bezerros do controle foi de 51,0% de machos ($N = 382$). O esperma de seleção X resultou em 87,7% de fêmeas, enquanto que o esperma da seleção Y produziu 93,6% de machos ($N = 94$). Os poucos bezerros que estavam mortos no nascimento não tiveram o sexo registrado e não estão incluídos.

O desenvolvimento recente da separação por citometria de fluxo de espermatozóides de garanhões resultou na produção de crias eqüinas normais com sexo pré-selecionado (Lindsey, A.C., Morris, L.H., Allen, W.R., Schenk, J.L., Squires, E.L., Bruemmer, J.E., *Equine Vet. J.* 34:128-132, 2002). Para que esta tecnologia seja acessível, o sêmen deve ser transportado do citômetro de fluxo até a égua. Este estudo examinou a longevidade e o estado dos acrossomas dos espermatozóides de garanhões após a pré-seleção do sexo. Três ejaculados de cada um dos 7 garanhões foram coletados por vagina artificial e transportados para o laboratório a 20°C por 2-6 h em um diluente de leite desnatado e glicose (1:1 v/v). O sêmen foi centrifugado a 400 x g por 10 min e o plasma seminal foi removido. O agregado espermático foi recolocado em suspensão a $100 \times 10^6/\text{mL}$ em meio de Tyrode modificado de Kenney (KMT), corado com Hoechst 33342 (5 mg/mL, Sigma Aldrich, de St. Louis, MO, E.U.A.), incubado por 30 min e submetido à citometria de fluxo. Os espermatozóides selecionados foram centrifugados e recolocados em suspensão a 40×10^6 em KMT, em alíquotas de 250 μL para estocagem por 48 h a 4°C ou 20°C. A motilidade progressiva total

(TPM) e o estado dos acrossomas dos espermatozóides foram avaliados antes de selecionar, em 0, 2, 12, 24, 36 e 48 h após a seleção. A motilidade progressiva total (TPM) foi avaliada microscopicamente e os acrossomas foram corados com FITC-PNA (Sigma-Aldrich) e classificados como intactos, remendados ou perdidos. O efeito dos ganhões, do tempo e das temperaturas de estocagem foi analisado usando o procedimento Proc GLM e foram feitas comparações de médias mínimas (SAS Institute).

Houve um efeito de ganhão ($p = 0,03$) sobre a motilidade dos espermatozóides e sobre a proporção de acrossomas intactos com o tempo. A coloração e incubação dos espermatozóides com Hoechst 33342 resultaram em um decréscimo na proporção de acrossomas intactos (Tabela 1). Entretanto, a proporção de acrossomas intactos observada após a seleção foi mais alta do que na população espermática antes da seleção. A proporção de acrossomas intactos declinou ($p < 0,0001$) conforme os acrossomas perdidos aumentaram ($p < 0,0001$) durante 48 h após a seleção, mas não houve qualquer efeito de tempo sobre a proporção de acrossomas remendados. Houve um efeito significativo da temperatura de estocagem dos espermatozóides após a seleção, de tal modo que a estocagem por 12 h a 20°C resultou em motilidade mais alta do que a estocagem a 4°C. A seleção por sexos dos espermatozóides por citometria de fluxo resulta na seleção de uma população de espermatozóides que pode manter a integridade dos acrossomas por 24 h, equivalente a espermatozóides frescos. A manutenção da longevidade dos espermatozóides por 12 h após a separação por FACS deve permitir que os espermatozóides selecionados por sexo sejam transportados até as águas localizadas a alguma distância o local da citometria de fluxo.

Tabela 1

Motilidade e Estado dos Acrossomas de Espermatozóides Selecionados por Fluxo com o Tempo

Estágio do Processamento	TPM	Acrossomas Intactos
Antes da coloração	$50,7 \pm 10,2$	$57,1 \pm 28,2$
Após a coloração	$42,0 \pm 17,1$	$42,3 \pm 26,7$
Após a incubação	$48,0 \pm 15,7$	$34,9 \pm 27,1^a$

0 h	Após seleção	49,9 \pm 18,3	60,2 \pm 22,3 ^b
2 h	4°C	34,3 \pm 19,3	47,1 \pm 28,3
	20°C	40,8 \pm 21,8	53,9 \pm 24,5
12 h	4°C	8,5 \pm 12,8 ^a	59,8 \pm 19,7
	20°C	27,0 \pm 21,0 ^b	66,6 \pm 12,0
24 h	4°C	4,8 \pm 12,9	56,2 \pm 16,8
	20°C	17,2 \pm 17,9	64,3 \pm 16,4
48 h	4°C	0,0 \pm 0,0	32,7 \pm 25,0
	20°C	5,1 \pm 8,6	41,6 \pm 24,0

^{a,b} Valores dentro de uma coluna com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Crias eqüinas com sexo predeterminado foram produzidas precisa e confiavelmente em um instituto de pesquisa (Lindsey *et al.*, *Equine Vet. J.* 34:128-132, 2002). O esperma selecionado por sexo seria utilizado mais eficientemente pela indústria, entretanto, se as células espermáticas selecionadas por sexo, congeladas e depois descongeladas estivessem disponíveis. O objetivo deste estudo foi comparar as características de movimento dos espermatozóides que tinham sido estocados por 18 h a 15°C. Dois ejaculados foram usados de cada um dos cinco garanhões. Após a coleta, os espermatozoides de ambos tratamentos foram diluídos para $25 \times 10^6/\text{mL}$ em meio de Tyrode modificado de Kenney (KMT), e estocados em um banho de água a 15°C por 18 h. Depois da estocagem, os espermatozoides foram deixados atingir a temperatura ambiente (~22°C) antes de centrifugar a $600 \times g$ por 10 min. O plasma seminal foi removido e o agregado espermático foi recolocado em suspensão a 500×10^6 em KMT. Uma alíquota de esperma foi removida (controle) desta amostra, diluída até $87 \times 10^6/\text{mL}$ em um diluente de leite desnatado e gema de ovo para congelamento (4% de glicerina; FR5), e deixada resfriar lentamente até 5 °C por 90 min, antes de congelar em vapor de nitrogênio líquido. Uma segunda alíquota de esperma (selecionada por fluxo) foi diluída até $100 \times 10^6/\text{mL}$, corada com Hoechst 33342 (5 mg/mL, Sigma-Aldrich, de St. Louis, MO, E.U.A.), incubada por 30 min, e subsequentemente selecionada por citometria de fluxo. O esperma selecionado foi centrifugado a $850 \times g$ por 20 min, recolocado em suspensão a $87 \times 10^6/\text{mL}$ em FR5, e deixada

resfriar lentamente até 5°C por 90 min, antes de efetuar crioconservação. O esperma para ambos os tratamentos foram embalados em bisnagas de 0,25 mL, e cada bisnaga continha 20 milhões de espermatozóides. Os espermatozóides foram avaliados (cegamente) quanto à motilidade progressiva visual (2 observadores) em 30 e 90 min após o descongelamento. Uma alíquota do esperma da cada bisnaga foi diluída em KMT e também em KMT contendo cafeína 2 mM. As amostras foram deixadas equilibrar por 5-10 min a 37°C antes da avaliação. Uma segunda bisnaga de cada tratamento foi avaliada (com e sem cafeína), usando o Analisador de Motilidade Hamilton-Thorn (CAS). Os resultados estão na Tabela 1. As diferenças nos parâmetros de movimento foram determinadas por ANOVA. De acordo com a maioria das respostas medidas, a seleção por fluxo foi prejudicial para a motilidade dos espermatozóides. Adicionalmente, a cafeína 2 mM melhorou muitas respostas dos espermatozóides. Houve uma interação pela qual a cafeína melhorou algumas respostas mais para os espermatozóides selecionados do que para os espermatozóides do controle. Portanto, o dano causado pela seleção pode ser parcialmente compensado pela cafeína. É possível que uma compensação similar possa ocorrer no trato reprodutor das éguas. Estudos estão atualmente em andamento para comparar a fertilidade do esperma de garanhões estocado crioconservado com o esperma que foi estocado e selecionado antes da crioconservação.

Tratamento	Vis 30	Vis 90	CASA Tot	CASA Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Controle-C	50 ^a	47 ^a	64 ^a	60 ^a	94 ^a	80 ^a	164 ^a	6,19 ^a	33 ^a	83 ^a	50 ^a
Controle	45 ^a	40 ^b	50 ^b	44 ^b	82 ^a	69 ^a	144 ^a	5,73 ^a	33 ^a	82 ^a	50 ^a
Selecionado-C	32 ^b	31 ^c	32 ^c	21 ^c	48 ^b	38 ^b	98 ^b	4,75 ^b	41 ^b	73 ^b	39 ^b
Selecionado	18 ^c	16 ^d	24 ^d	12 ^d	39 ^b	30 ^b	80 ^b	4,51 ^b	37 ^c	69 ^b	38 ^b

^{a,b,c,d}Valores na mesma coluna sem sobrescritos comuns diferem (P < 0,05)

Tratamentos C estimulados com cafeína 2 mM

Alces fêmeos com 3-6 anos de idade nos Estados de Colorado e Minnesota dos Estados Unidos da América do Norte foram sincronizados quanto ao estro no mês de setembro pela inserção de um CIDR de progesterona dentro da vagina por 12-14 dias. Após a remoção do CIDR, administrou-se 200 UI de eCG por via intramuscular e os alces fêmeos foram inseminados de forma

cronometrada 60 h depois. Sêmen fresco foi coletado via eletroejaculação de um alce macho com 5 anos de idade, e resfriado lentamente em 4 h até cerca de 20°C para transporte como um ejaculado puro até o laboratório de seleção de espermatozóides. O ejaculado foi concentrado até 1×10^9 espermatozóides/mL, para ser filtrado, centrifugando alíquotas de 1,5 mL por 10 s a 15.000 x g. O sêmen foi incubado em Hoechst 33342 112 μ M a 200×10^6 espermatozóides/mL em um meio TALP por 45 min a 34°C, e depois diluído até 100×10^6 para seleção. O esperma foi selecionado na base de teor de DNA diferente do esperma portador dos cromossomas X e Y. O esperma de alce portador do cromossoma X continha 3,8% mais DNA do que o esperma portador do cromossoma Y. Os espermatozóides foram selecionados por fluxo em um período de 4 h, usando MoFlo[®]SX, operando a 0,345 MPa (50 lb/in²) com um líquido prepucial baseado em TRIS. As bandas 351 e 364 de um laser de argônio, emitindo 150 mW, excitou o corante Hoechst 33342 ligado ao DNA. Os espermatozóides portadores dos cromossomas X e Y foram coletados (~92% de pureza, verificada reanalisando alíquotas de esperma submetidas a ultra-som quanto ao DNA) foram coletados a ~4.700 espermatozóides/segundo em tubos contendo 2 mL de diluente de 20% de gema de ovo em TRIS. Volumes selecionados de 15 mL foram coletados seqüencialmente. Aproximadamente 110×10^6 espermatozóides de cada sexo foram selecionados e resfriados até 5°C em 90 min. Um volume igual de diluente contendo glicerina (12%) foi adicionado ao volume selecionado a 5°C. Alíquotas de espermatozóides selecionados contendo 30 mL foram concentradas por centrifugação a 4 °C por 20 min a 850 x g. Os aglomerados espermáticos foram selecionados, ajustados para $21,7 \times 10^6$ espermatozóides/mL e carregados em bisnagas de 0,25 mL. Cada bisnaga, contendo 5×10^6 espermatozóides totais, foi congelada em vapor de nitrogênio líquido. Como controle, 5×10^6 espermatozóides totais do mesmo ejaculado foram congelados em bisnagas de 0,25 mL na mesma hora que o esperma sexuado. Depois de descongelar por 30 s a 37°C, 65% e 60% do esperma (controle e sexuado, respectivamente) eram progressivamente móbeis, como determinado por estimativas visuais. Os alces fêmeos em 3 locais e esquemas de manejo diferentes foram inseminados usando deposição transcervical de sêmen rotineira no corpo

uterino. A prenhez foi determinada 40 dias após a inseminação, analisando o sangue quanto à Proteína B Específica de Gravidez (Bio Tracking, Moscow, Idaho, E.U.A.). Os alces fêmeos em um local estavam condições ruins na hora da inseminação e nenhuma prenhez foi conseguida com esperma sexuado ou do controle. O índice de prenhez nos outros locais com esperma sexuado (61%; 11/18) foi similar àquele dos inseminados do controle (50%; 3/6). Estes índices de prenhez (sexuados e controles) resultaram de menos espermatozóides do que são usados em inseminação normal de alces fêmeos. Nove entre onze (82%) dos filhotes sexuados foram do sexo previsto.

A invenção pode incluir ainda um mamífero produzido de acordo com qualquer uma das modalidades da invenção descrita acima, ou pode incluir um mamífero de sexo predeterminado de acordo com as várias modalidades da invenção que fornecem amostras de células espermáticas para inseminação, que têm uma população enriquecida de células espermáticas portadoras do cromossoma X ou população enriquecida de células espermáticas portadoras do cromossoma Y, ou um mamífero produzido de acordo com qualquer modalidade da invenção na qual se usa uma amostra de células espermática para inseminação, contendo um baixo número de células espermáticas, comparado com o número típico usado para inseminar essa espécie específica de mamífero, ou a progênie de alce produzida de acordo com a invenção, como descrito acima.

Como pode ser facilmente entendido a partir do texto precedente, os conceitos básicos da presente invenção podem ser incorporados de uma série de maneiras. Isto envolve um sistema para processar células espermáticas, incluindo técnicas, bem como dispositivos, para realizar o processamento de células espermáticas. Neste pedido de patente, várias técnicas de processamento de células espermáticas estão descritas como parte dos resultados indicados como tendo sido atingidos pelos vários dispositivos descritos, e como etapas que são inerentes à utilização. Elas são simplesmente o resultado natural de utilizar os dispositivos como pretendido e descrito. Além disso, embora alguns dispositivos estejam descritos, deve-se entender que eles não somente realizam certos métodos, mas também podem ser variados de inúmeras maneiras. É importante quanto ao

acima descrito que todas essas facetas devem ser entendidas como estando englobadas por este relatório descritivo.

A discussão incluída neste pedido de patente provisória pretende servir como uma descrição básica. O leitor deve ficar ciente de que a discussão
5 específica pode não descrever explicitamente todas as modalidades possíveis; muitas alternativas são implícitas. Ela pode também não explicar completamente a natureza genérica da invenção e pode não indicar explicitamente como cada característica ou elemento pode realmente ser representativo de uma função mais ampla ou de uma série grande de elementos alternativos ou equivalentes.
10 Novamente, estes últimos estão implicitamente incluídos neste relatório descritivo. Quando a invenção está descrita em terminologia orientada para dispositivos, cada elemento do dispositivo realiza implicitamente uma função. As reivindicações de aparelhos podem não somente estar incluídas para o dispositivo descrito, mas também as reivindicações de métodos ou processos podem estar
15 incluídas para realizar as funções que a invenção e cada elemento realiza. Nem a descrição nem a terminologia pretendem limitar o âmbito das reivindicações que devem ser incluídas em um pedido de patente completo.

Deve-se entender também que muitas mudanças podem ser feitas sem fugir da essência da invenção. Tais mudanças estão também implicitamente
20 incluídas na descrição. Elas caem ainda dentro do âmbito desta invenção. Uma ampla descrição que engloba a modalidade ou modalidades explícitas indicadas, a grande série de modalidades alternativas implícitas, e os amplos métodos ou processos, e similares, estão englobados por este relatório descritivo.

Além disso, cada um dos vários elementos da invenção e das
25 reivindicações também pode ser realizado de uma série de maneiras. Este relatório descritivo deve ser entendido como englobando cada uma destas variações, seja ela uma variação de uma modalidade de qualquer modalidade de aparelho, uma modalidade de método ou processo, ou mesmo meramente uma variação de qualquer elemento delas. Particularmente, deve-se entender que,
30 como a descrição se refere a elementos da invenção, as palavras para cada elemento podem ser expressas por termos de aparelhos ou termos de métodos equivalentes, mesmo se apenas a função ou o resultado seja o mesmo. Tais

termos equivalentes, mais amplos, ou mesmo mais genéricos devem ser considerados como estando englobados na descrição de cada elemento ou ação. Tais termos podem ser substituídos, quando desejado, para tornar explícita a cobertura implicitamente ampla à qual esta invenção está intitulada. Apenas como

5 um exemplo, deve-se entender que todas as ações podem ser expressas como um meio para realizar essa ação ou como um elemento que causa esta ação. Similarmente, cada elemento físico descrito deve ser entendido como englobando uma descrição da ação que esse elemento físico possibilita. Quanto a este último aspecto, apenas como um exemplo, a descrição de um "selecionador por fluxo"

10 deve ser entendida como englobando a descrição do ato de "selecionar por fluxo", esteja ou não explicitamente discutido, e inversamente, caso houvesse efetivamente a descrição do ato de "selecionar por fluxo", tal descrição deve ser entendida com englobando a descrição de um "selecionador por fluxo", e mesmo um "meio para selecionar por fluxo". Tais mudanças e termos alternativos devem

15 ser entendidos como estando explicitamente incluídos na descrição.

Quaisquer atos de lei, leis, regulamentos ou normas mencionadas neste pedido de patente; ou patentes, publicações, ou outras referências mencionadas neste pedido de patente são aqui incorporados como referência. Além disso, quanto a cada termo utilizado, deve-se entender que, a menos que sua

20 utilização neste pedido de patente seja inconsistente com tal interpretação, as definições comuns dos dicionários devem ser entendidas como estando incorporadas para cada termo e todas as definições, termos alternativos, e sinônimos, tais como contidos no "Random House Websters' Unabridged Dictionary", segunda edição, são aqui incorporados como referência. Finalmente,

25 todas as referências listadas na lista de Referências A Serem Incorporadas Como Referência De Acordo Com O Pedido De Patente Provisória ou outras declarações de informações depositadas com o pedido de patente são aqui apensadas e aqui incorporadas como referência; entretanto, quanto a cada um dos acima mencionados, até o grau em que tais informações e declarações incorporadas

30 como referência possam ser consideradas inconsistentes com o patenteamento desta invenção, tais declarações não devem ser expressamente consideradas como feitas pela Requerente.

Assim sendo, a Requerente deve ser entendida como reivindicando pelo menos: (i) cada um dos dispositivos de processamento de células espermáticas, como aqui relevados e descritos; (ii) os métodos relacionados revelados e descritos; (iii) variações similares, equivalentes, e mesmo implícitas de cada um destes dispositivos e métodos; (iv) os desenhos alternativos que realizam cada uma das funções indicadas como reveladas e descritas; (v) os desenhos e métodos alternativos que realizam cada uma das funções indicadas como são implícitas para realizar aquela que está revelada e descrita; (vi) cada característica, componente e etapa indicada como invenções separadas e independentes; (vii) as aplicações aperfeiçoadas pelos vários sistemas ou componentes revelados; (viii) os produtos resultantes produzidos por tais sistemas ou componentes; e (ix) métodos e aparelhos substancialmente como descritos aqui anteriormente e com relação a qualquer um dos exemplos que os acompanham; (x) as várias combinações e permutações de cada um dos elementos descritos; e (xi) cada reivindicação ou conceito potencialmente dependente como uma dependência de cada uma e qualquer uma das reivindicações ou conceitos independentes apresentados. A este respeito, deve-se entender que por razões práticas e de modo a evitar adicionar potencialmente centenas de reivindicações, a Requerente pode eventualmente apresentar reivindicações com apenas dependências iniciais. Deve-se entender que existe fundamento até o grau necessário sob novas questões de direito, inclusive, porém sem limitações, o Artigo 123(2) da Convenção Européia de Patentes, e da Lei de Patentes dos Estados Unidos da América do Norte, 35 USC 132, ou outras leis afins, permitir a adição de qualquer uma das várias dependências ou elementos apresentados sob qualquer reivindicação ou conceito independente. Além disso, se ou quando utilizado, o uso da frase transitiva "compreendendo" é usado para manter as reivindicações "ilimitadas" em questão, de acordo com a interpretação tradicional de reivindicações. Assim sendo, a menos que o contexto requeira diferentemente, deve-se entender que o termo "compreender" ou variações tais como "compreende" ou "compreendendo" pretendem inferir a inclusão de um elemento ou etapa ou grupo de elementos ou etapas, porém não a exclusão de qualquer outro elemento ou etapa ou grupo de elementos ou etapas. Tais termos devem ser

interpretados na sua forma mais expansiva de modo a proporcionar à Requerente a cobertura mais ampla legalmente permissível.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para gerar uma amostra de células espermáticas não-humanas para inseminação tendo ao menos uma característica de fertilidade controlada, sendo o método **caracterizado por** compreender as etapas de:

- 5 a. obtenção de sêmen de um macho de um mamífero não-humano;
- b. geração de uma corrente de líquido apresentando características de fluxo dentro de um citômetro de fluxo ou separador de células;
- c. introdução das células espermáticas na dita corrente de
10 líquido;
- d. ajuste da pressão da corrente de líquido entre 0,207 MPa e 0,345 MPa de forma a alterar o fluxo da corrente de líquido;
- e. controle das características de fertilidade das células espermáticas, em que as características de fertilidade compreendem motilidade
15 das células espermáticas, viabilidade das células espermáticas, índice de prenhez de uma fêmea da dita espécie de mamífero, índice de clivagem de oócitos fertilizados e proporção de blastocistos de oócitos fertilizados, através do ajuste da dita pressão da corrente de líquido entre ,207 MPa e 0,345 MPa; e
- f. geração de uma amostra de células espermáticas para
20 inseminação que tem características controladas e melhoradas da fertilidade das células espermáticas.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita espécie de mamífero ser selecionada no grupo que consiste em espécie bovina de mamífero, uma espécie equina de mamífero, uma espécie ovina de
25 mamífero, uma espécie canina de mamífero, uma espécie felina de mamífero, uma espécie suína de mamífero, uma espécie marinha de mamífero, uma espécie cervel de mamífero, uma espécie primata de mamífero, uma espécie caprina de mamífero.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado**
30 **pela** dita corrente de líquido compreender uma corrente de líquido prepucial.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pela** dita corrente de líquido prepucial compreender um líquido prepucial que contém solução salina tamponada com fosfato (*PBS*).

5 5. Método de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pela** dita corrente de líquido prepucial compreender um líquido prepucial que contém tampão de citrato.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** dito tampão de citrato compreender cerca de 2,9% de citrato de sódio.

10 7. Método de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pela** dita corrente de líquido prepucial compreender um líquido prepucial que contém tampão de *HEPES*.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender ainda a etapa de obter o sêmen de um macho de uma espécie de mamífero compreendendo a obtenção do dito sêmen bovino do dito macho de
15 uma espécie bovina de mamífero.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender ainda a etapa de obter o sêmen de um macho de uma espécie de mamífero, e pela dita etapa de alterar as características de fluxo da dita corrente de líquido para ajustar a pressão da corrente de líquido compreender o ajuste das
20 ditas características de fluxo da dita corrente de líquido, ajustando a pressão da corrente de líquido para cerca de 0,276 MPa (40 lb/in²).

10. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender ainda a etapa de obter o sêmen de uma espécie equina de mamífero.

25 11. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender ainda a etapa de obter o sêmen de um macho de uma espécie equina de mamífero.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender ainda a etapa de obter o sêmen de um macho de uma espécie equina de mamífero, e pela dita etapa de ajustar a pressão da corrente de líquido compreende o ajuste da pressão da corrente de líquido para cerca de 0,276 MPa (40 lb/in²).

30

13. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita característica de fertilidade compreender a motilidade das células espermáticas bovinas.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita característica de fertilidade compreender a motilidade das células espermáticas equinas.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita característica de fertilidade compreender a viabilidade das células espermáticas bovinas.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita característica de fertilidade compreender a viabilidade das células espermáticas equinas.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita característica de fertilidade compreender o índice de prenhez da dita fêmea da dita espécie bovina de mamífero, inseminada com uma amostra de células espermáticas bovinas para inseminação, que tem características controladas da fertilidade das células espermáticas.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita característica de fertilidade compreender o índice de prenhez da dita fêmea da dita espécie equina de mamífero, inseminada com uma amostra de células espermáticas equinas para inseminação, que tem características controladas da fertilidade das células espermáticas.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita característica de fertilidade compreende o índice de clivagem de oócitos bovinos fertilizados com a dita amostra de células espermáticas bovinas para inseminação, que tem características controladas da fertilidade das células espermáticas.

20. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita característica de fertilidade compreender o índice de clivagem de oócitos equinos fertilizados com a dita amostra de células espermáticas equinas para inseminação, que tem características controladas da fertilidade das células espermáticas.

21. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita característica de fertilidade compreender a proporção de blastocistos de oócitos bovinos fertilizados com a dita amostra de células espermáticas bovinas para inseminação, que tem características controladas da fertilidade das células espermáticas.

22. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** dita característica de fertilidade compreender a proporção de blastocistos de oócitos equinos fertilizados com a dita amostra de células espermáticas equinas para inseminação, que tem características controladas da fertilidade das células espermáticas.

23. Método de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pela** dita amostra de células espermáticas bovinas para inseminação, que tem características de fertilidade controladas das células espermáticas, conter entre cerca de 1×10^5 e 2×10^7 células espermáticas bovinas.

24. Método de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pela** dita amostra de células espermáticas bovinas para inseminação, que tem características de fertilidade controladas das células espermáticas, conter entre cerca de 1×10^6 e 3×10^6 células espermáticas bovinas.

25. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender ainda a etapa de corar as ditas células espermáticas.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado pela** etapa de corar as ditas células espermáticas compreender corar as ditas células espermáticas com *Hoechst* 33342.

27. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender ainda gerar gotículas na dita corrente de líquido, algumas destas gotículas contendo uma das ditas células espermáticas.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado por** compreender ainda diferenciar as ditas células espermáticas, baseado em uma característica de sexo.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado pela** dita etapa de diferenciar as ditas células espermáticas, baseado em uma

característica de sexo, compreender diferenciar as ditas células espermáticas baseando-se na quantidade do conteúdo do *DNA*.

30. Método de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado pela** dita etapa de diferenciar as ditas células espermáticas, baseado em uma característica de sexo, compreender diferenciar as ditas células espermáticas baseando-se no volume da cabeça do esperma.

31. Método de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado por** compreender ainda a etapa de separar células espermáticas, baseado na dita característica de sexo.

10 32. Método de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado por** compreender ainda a etapa de coletar a dita amostra de células espermáticas para inseminação, que tem características controladas de fertilidade das células espermáticas, em um recipiente de coleta.

15 33. Método de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado pela** dita etapa de coletar a dita amostra de células espermáticas para inseminação, que tem características controladas de fertilidade das células espermáticas, em um recipiente de coleta compreender coletar uma amostra de células espermáticas para inseminação, selecionada por sexo, no dito recipiente de coleta.

20 34. Método de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado pela** dita amostra de células espermáticas ser usada para inseminação artificial.

35. Método de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado pela** dita amostra de células espermáticas ser usada para fertilização *in vitro*.

25 36. Método de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado pela** dita amostra de células espermáticas ser usada para injeção intracitoplasmática.

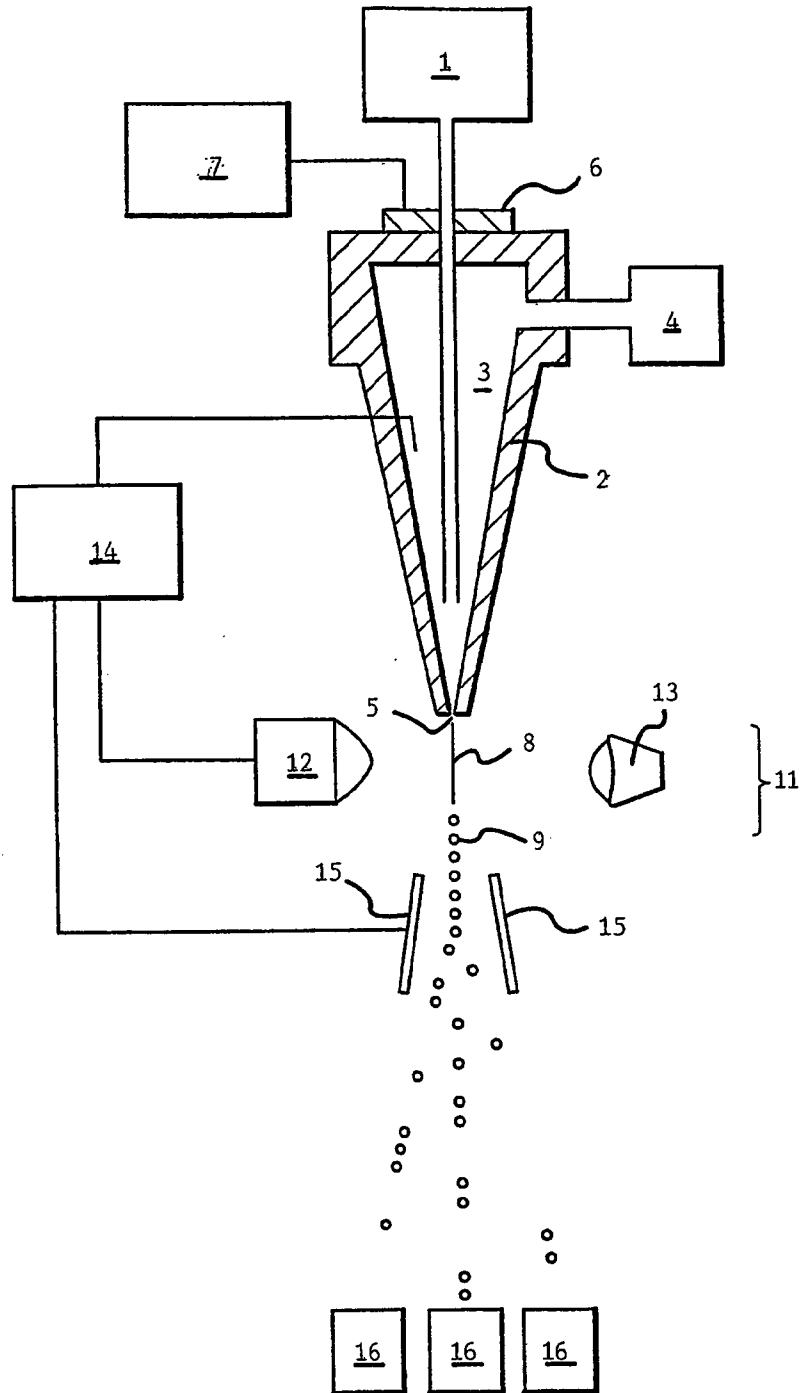


FIG.1

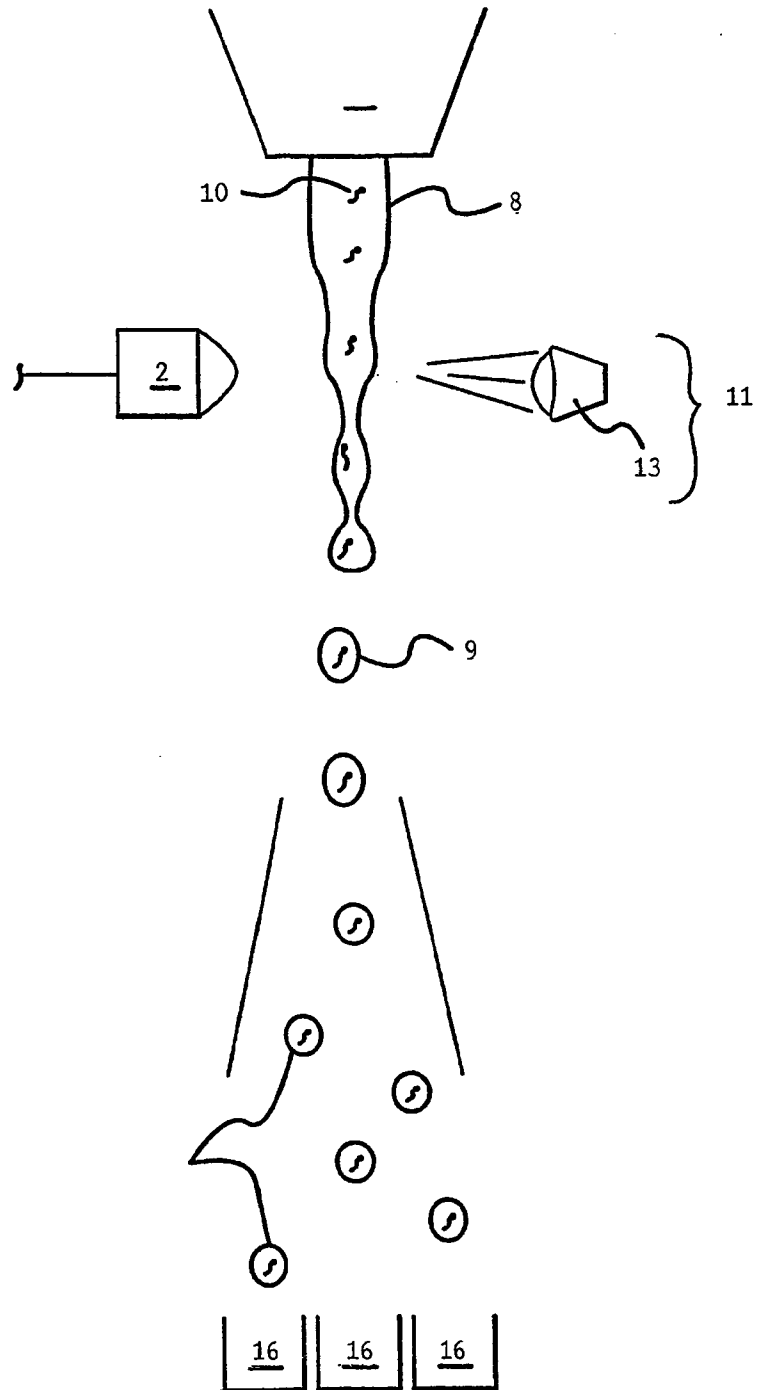


FIG.2

RESUMO

Patente de Invenção para: **“SISTEMA DE SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS A BAIXA PRESSÃO”**

5 A presente invenção descreve um sistema de processamento de células espermáticas para gerar amostras de células espermáticas para inseminação, tendo características controladas da fertilidade das células espermáticas.