



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0312843-1 B1**



**(22) Data do Depósito: 22/07/2003**

**(45) Data de Concessão: 03/12/2019**

---

**(54) Título:** MÉTODO PARA SEPARAR CÉLULAS ESPERMÁTICAS

**(51) Int.Cl.:** C12N 5/076; C12N 5/02; A61B 17/43.

**(30) Prioridade Unionista:** 22/07/2002 US 60/400,486.

**(73) Titular(es):** XY, LLC.

**(72) Inventor(es):** ALLISON C. LINDSEY; JOHN L. SCHENK.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2003022906 de 22/07/2003

**(87) Publicação PCT:** WO 2004/009237 de 29/01/2004

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 21/01/2005

**(57) Resumo:** "SISTEMA PARA PROCESSAR CÉLULAS ESPERMÁTICAS". Descreve-se um sistema para processar sêmen ou células espermáticas, a fim de manter ou intensificar os atributos biológicos, químicos, físicos, fisiológicos ou funcionais de células espermáticas, dentro do contexto de procedimentos de coleta, manuseio, estocagem, transporte, separação ou inseminação.

## **RELATÓRIO**

### **Patente de Invenção para "MÉTODO PARA SEPARAR CÉLULAS ESPERMÁTICAS"**

#### **CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO**

[001] Esta invenção refere-se a um sistema para processar sêmen ou células espermáticas, a fim de manter ou melhorar 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.

#### **CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO**

[002] 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. A separação das células espermáticas portadoras do cromossoma X das células espermáticas portadoras do cromossoma Y pode ser realizada como aqui descrito e como descrito em vários pedidos de patente internacional, como por exemplo: PCT/US99/17165; PCT/US98/27909; PCT/US01/45237; PCT/US01/18879; PCT/US01/1515; e PCT/US01/02304, e nos pedidos de patente norte-americana n<sup>os</sup> US 09/582.809 e US 09/015.454, sendo cada um deles aqui incorporado como referência. Não se pretende que estes exemplos de como separar células espermáticas portadoras do cromossoma X das células espermáticas portadoras do cromossoma Y limitem a presente invenção de um sistema para processar células espermáticas à tecnologia de processamento de esperma com dispositivos de separação por citometria de fluxo ou métodos de separação por fluxo, porém pelo contrário, esses exemplos são ilustrativos de vários processos pelos quais as células espermáticas podem ser separadas umas das outras, e são ilustrativos da maneira pela qual as células espermáticas são coletadas, manuseadas,

separadas, transportadas, usadas ou estocadas, como um contexto no qual a presente invenção pode ser entendida.

[003] Um problema significativo com as células espermáticas que foram separadas em subpopulações, baseado em uma característica específica das células espermáticas, pode ser a motilidade mais baixa, viabilidade mais baixa ou fertilidade mais baixa. Outro aspecto deste problema pode ser que os procedimentos convencionais para manusear e transportar sêmen antes da separação das células espermáticas em subpopulações são conduzidos a cerca de 5°C ou em uma temperatura na qual os lipídeos da membrana das células espermáticas tenham passado de uma fase líquida para uma fase gel. A passagem dos lipídeos da membrana das células espermáticas da fase líquida para a fase gel pode alterar os atributos químicos, físicos, fisiológicos ou funcionais das células espermáticas, o que pode resultar em fertilidade mais baixa de tais células espermáticas ou pode resultar na morte das células espermáticas. Outro aspecto deste problema pode ser que a temperatura na qual os lipídeos da membrana das células espermáticas passam da fase líquida para a fase gel pode variar, dependendo da espécie de mamífero do qual o sêmen é obtido. Assim sendo, a temperatura na qual as células espermáticas de uma espécie específica de mamífero devem ser mantidas para impedir a passagem dos lipídeos da membrana de células espermáticas da fase líquida para a fase gel deve ser determinada antes dos procedimentos subseqüentes de coleta, manuseio, transporte e separação. Outro aspecto deste problema é o entendimento convencional de que o sêmen coletado deve ter sua temperatura reduzida para manter a viabilidade e a fertilidade das células espermáticas durante os procedimentos subseqüentes de manuseio, transporte ou separação, o que contaria os ensinamentos da presente invenção de incubar ou manter a temperatura do sêmen coletado em uma

temperatura que é substancialmente mais alta do que a prática convencional existente.

[004] Outro problema significativo com os procedimentos convencionais para a separação de células espermáticas em subpopulações pode ser que a concentração de corante à qual as células espermáticas são expostas pode ser alta demais para as células espermáticas obtidas de certas espécies de mamíferos. Por exemplo, as células espermáticas eqüinas expostas à concentração do corante Hoechst 33342 usada convencionalmente para corar as células espermáticas bovinas pode provocar perda substancial de fertilidade.

[005] Outro problema significativo com os procedimentos convencionais para a separação de células espermáticas em subpopulações pode ser que a extensão do tempo em que as células espermáticas são incubadas no corante, tal como Hoechst 33342, pode ser longa demais para certas espécies de mamíferos. Por exemplo, as células espermáticas eqüinas incubadas no corante Hoechst 33342 por uma hora podem apresentar perda substancial de motilidade ou fertilidade.

[006] Ainda outro problema significativo com os procedimentos convencionais para manusear sêmen pode ser a extensão do sêmen com composições nas quais as células espermáticas apresentam perda substancial de motilidade ou fertilidade.

[007] Muito embora os vários dispositivos e métodos para separar células espermáticas tenham melhorado, problemas significativos continuam com relação a manter a viabilidade do esperma durante os processos de coleta, manuseio, transporte, separação, uso ou estocagem.

### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

[008] Conseqüentemente, o objeto amplo da invenção pode ser fornecer dispositivos ou métodos para a coleta, manuseio, transporte,

estocagem ou separação de sêmen ou células espermáticas, para manter a viabilidade do esperma.

[009] Outro objeto amplo da invenção pode ser fornecer dispositivos ou métodos para coletar, manusear, transportar, estocar ou separar sêmen ou células espermáticas obtidas de várias espécies de mamíferos, inclusive, porém sem limitações, eqüídeos, bovídeos, felídeos, ovídeos, canídeos, búfalo, zebu, alce, ou suínos; ou obtidas de indivíduos premiados, ameaçados de extinção ou raros de uma espécie de mamífero; ou obtidas de espécies zoológicas para manter ou aumentar viabilidade do esperma.

[010] Outro objeto significativo da invenção pode ser fornecer dispositivos ou métodos para manusear e transportar células espermáticas obtidas de mamíferos eqüinos.

[011] Outro objeto significativo d invenção pode ser fornecer dispositivos ou métodos para separar células espermáticas, que conseguem manter maior viabilidade de células espermáticas de mamíferos durante todo processo de seleção por fluxo.

[012] Outro objeto significativo da invenção pode ser fornecer dispositivos ou métodos para manter células espermáticas em maior viabilidade com o propósito de inseminação artificial de várias espécies de mamíferos, tais como aquelas descritas acima, ou mesmo inseminação artificial com um número baixo ou reduzido de células espermáticas, comparado com o número usual ou o número típico de células espermáticas usadas em tais procedimentos de inseminação artificial, estejam ou não tais células espermáticas separadas em células espermáticas enriquecidas portadoras do cromossoma X ou portadoras do cromossoma Y.

[013] Outro objeto significativo da invenção pode ser fornecer métodos nos quais as células espermáticas são incubadas em temperaturas acima das quais os lipídeos da membrana das células espermáticas passam de uma fase líquida para uma fase gel.

[014] Outro objeto significativo da invenção pode ser fornecer dispositivos ou métodos para transportar esperma de garanhões antes da separação com seleção por fluxo das células espermáticas.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[015] A Figura 1 fornece um gráfico que ilustra que, conforme a concentração de corante aumenta, a motilidade total e progressiva das células espermáticas diminui, a porcentagem de células espermáticas mortas aumenta, e a capacidade de as técnicas de citometria de fluxo resolverem células espermáticas portadoras do cromossoma X de células espermáticas portadoras do cromossoma Y aumenta.

[016] A Figura 2 fornece um gráfico que ilustra que as células espermáticas estendidas em KMT permanecem mais móveis em relação a células espermáticas frescas e também células espermáticas estocadas por um tempo à temperatura ambiente, tal como 18 horas à temperatura ambiente.

[017] A Figura 3 fornece um gráfico que ilustra que corar as células espermáticas em pH mais alto pode diminuir a porcentagem de células espermáticas mortas em amostras de células espermáticas coradas e aumentar a resolução avaliada por análise de citometria de fluxo.

[018] A Figura 4 fornece um gráfico que ilustra que diminuindo o período de incubação com corante de um período convencional de 60 minutos para um período de incubação de cerca de 30 minutos pode aumentar a motilidade, diminuir a porcentagem de células espermáticas mortas em amostras de células espermáticas coradas, e aumentar a resolução de células espermáticas portadoras do cromossoma X de células espermáticas portadoras do cromossoma Y, durante a seleção por fluxo de células espermáticas coradas.

[019] A Figura 5 fornece um gráfico que ilustra que a adição de um estimulante, tal como cafeína, pode aumentar a motilidade em células espermáticas.

[020] A Figura 6 fornece um gráfico que ilustra que a motilidade total e a motilidade progressiva de células espermáticas em relação a usar KMT modificado preparado usando  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

[021] A Figura 7 fornece um gráfico que ilustra que a motilidade total e a motilidade progressiva de células espermáticas podem ser aumentadas usando KMT modificado preparado usando  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , estejam ou não as células espermáticas expostas a um estimulante tal como cafeína.

[022] A Figura 8 fornece um gráfico que ilustra que a temperatura pode ser ajustada para estocar, manusear, transferir ou transportar células espermáticas obtidas de um macho de uma espécie de mamífero, para aumentar a motilidade total e progressiva.

[023] A Figura 9 fornece um gráfico que ilustra que a temperatura na qual as células espermáticas são transferidas, estocadas, ou manuseadas, antes de um protocolo de coloração, pode ser ajustada para aumentar a motilidade total ou progressiva de células espermáticas, ou células espermáticas estimuladas, ou células espermáticas estimuladas com cafeína.

[024] A Figura 10 fornece um gráfico que ilustra que a temperatura na qual as células espermáticas são transferidas, estocadas, ou manuseadas, antes de um protocolo de coloração, pode ser ajustada para aumentar a motilidade total ou progressiva de células espermáticas, ou células espermáticas estimuladas, ou células espermáticas estimuladas com cafeína, subsequente a um protocolo de coloração.

[025] A Figura 11 fornece um gráfico que ilustra que a porcentagem de células espermáticas mortas em amostras de células espermáticas coradas pode ser reduzida estocando ou transportando as células espermáticas a 15 °C.

[026] A Figura 12 fornece um gráfico que ilustra que as células espermáticas podem permanecer mais viáveis quando a concentração das células espermáticas durante a coloração é de cerca de 100 M/mL versus 200 M/mL, sem perda de resolução por citometria de fluxo.

[027] A Figura 13 fornece um gráfico que ilustra que, conforme a concentração do corante aumenta, menos células espermáticas sobrevivem e a resolução aumenta.

[028] A Figura 14 fornece um gráfico que ilustra que o tempo de coloração pode ser substancialmente diminuído sem perda de resolução entre populações portadoras do cromossoma X e populações portadoras do cromossoma Y de células espermáticas avaliadas por citometria de fluxo.

### **MODOS DE CONDUZIR A INVENCÃO**

[029] A presente invenção refere-se a um sistema para processar sêmen ou células espermáticas, a fim de manter ou melhorar 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.

### **EXEMPLO 1**

[030] Coletou-se sêmen de três garanhões com fertilidade aceitável, diluiu-se para  $25 \times 10^6$  espermatozóides/mL em um diluente de leite desnatado/glicose baseado em *Tyrode*, e estocou-se por 18 h a cerca de 5 °C ou cerca de 15 °C. Após a estocagem, os espermatozóides foram centrifugados para remover o plasma seminal e concentrar o esperma, corou-se com Hoechst 33342 (da Hoechst), e separou-se em populações portadoras do cromossoma X e portadoras do cromossoma Y, baseado no teor do DNA, usando um separador de esperma SX MoFlo®.

[031] Uma dose final de cerca de  $20 \times 10^6$  espermatozóides separados por fluxo em um volume de 300 µL foi usada para todas inseminações. O estro foi sincronizado em 35 éguas com idades de 2 a 12. Administrou-se

gonadotropina coriônica humana (hCG; 3.000 UI, intravenosa; Choluron<sup>®</sup>, da Intervet, de Millsboro, DE, E.U.A.), quando um folículo dominante com diâmetro  $\geq 35$  mm estava presente, e as éguas foram inseminadas aproximadamente 36 h após hCG. Na hora da inseminação, as éguas designadas a 1 entre 3 grupos de tratamento: (1) esperma que tinha sido estocado a 15°C, e inseminado usando a técnica vídeoendoscópica; (2) esperma estocado a 5°C e também inseminado usando o método vídeoendoscópico; e (3) esperma estocado a 5°C e inseminado usando a técnica com guia retal.

[032] As éguas foram sedadas imediatamente antes da inseminação usando butorfanol (4 mg, intravenoso; Torbugesic<sup>®</sup>, da Ft. Dodge Co., de Fort Dodge, IA, E.U.A.) e detomidina (6 mg, intravenoso; Dormosedan<sup>®</sup>, da Pfizer, de Lees Summit, MO, E.U.A.). As éguas foram avaliadas diariamente quanto à ovulação, e somente as éguas que ovularam dentro de 48 horas após a inseminação foram incluídas nos resultados. A prenhez foi determinada por ultra-sonografia 12 a 14 dias após a ovulação. As éguas receberam administração de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  no 16º dia após a ovulação, para uso em 2 ciclos subseqüentes.

[033] Os índices de prenhez entre éguas inseminadas por histeroscopia com esperma selecionado, estocado a 15°C, foram de cerca de 72%, ou a 5°C foi de cerca de 55%, como indicado na Tabela 1. Houve uma tendência (P = 0,12) de menos éguas ficarem prenhes após inseminação com guia retal (38%), comparado com inseminação por histeroscópio (55%), quando o esperma estocado selecionado foi inseminado.

Tabela 1

Índices de Prenhez Através de Inseminação Histeroscópica ou Guiada por Via Retal de Esperma Selecionado por Fluxo, Estocado a 5 °C ou 15 °C

Temperatura de Estocagem (°C)	Método de Inseminação	Éguas Inseminadas	Éguas Prenhes (14 dias)	Índice de Prenhez
15	Histeroscópico	25	18	72% <sup>a</sup>
5	Histeroscópico	22	12	55% <sup>a,b</sup>
5	Guia Retal	24	9	38% <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Valores na mesma coluna com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ )

[034] Um número maior de éguas ficou prenhe após a inseminação com espermatozoides selecionados estocados antes de selecionar a 15°C, comparado com 5°C. Este efeito foi consistente para todos os ganhos, como o foi à fertilidade após estocagem a 15°C por 18 h antes de selecionar, comparado com 5°C.

[035] O índice de prenhez esperado após a inseminação de  $1 \times 10^6$  espermatozoides de ganhos transportados por métodos padronizados (5°C, 12 a 72 h) é de 65%. O índice de prenhez obtido no presente estudo (72%) é impressionante, e demonstra um aperfeiçoamento dramático sobre aquele obtido (35%) com espermatozoides selecionados por fluxo, estocados por 18 h, usando tecnologia convencional. Este aumento na fertilidade pode se refletir no processamento do espermatozoide antes da citometria de fluxo. Os índices de prenhez no presente estudo teriam sido ainda mais altos, exceto que por dois dias durante esta aplicação da invenção, os índices de prenhez para todas as éguas foram extremamente baixos.

[036] A inseminação histeroscópica resultou em índices de prenhez mais altos do que a inseminação uterina profunda. Isto contrasta com Rigby *et al.*, que relataram índices de prenhez similares entre a inseminação vídeoendoscópica e guiada por via retal, quando espermatozoides transportados foram usados. Entretanto, esses resultados realmente indicaram uma vantagem de 12 pontos percentuais para a inseminação histeroscópica. Contrastando com aquele estudo, o presente ensaio utilizou espermatozoides selecionados por fluxo, que estão reconhecidamente em um

estado pré-capacitado. Resumindo, índices de prenhez excelentes foram obtidos com inseminação histeroscópica de espermatozóides estocados, selecionados por fluxo.

[037] Os índices de prenhez foram mais altos para todos três garanhões quando o esperma foi mantido a cerca de 15°C, comparado com 5°C. A inseminação histeroscópica com esperma mantido a 15°C resultou em índices de prenhez mais altos do que a inseminação guiada por via retal do esperma estocado a 5°C.

[038] Assim sendo, o sistema para processar células espermáticas da invenção pode envolver a obtenção de células espermáticas de um macho de uma espécie mamífera, manter as células espermáticas obtidas do macho da espécie de mamífero antes da inseminação artificial de uma fêmea da espécie de mamífero em uma temperatura(s) selecionada(s) dentro da faixa entre 5°C e 25°C que gera um índice de prenhez mais alto de tais fêmeas de tal espécie de mamífero. Com relação à espécie eqüina, e particularmente com relação à espécie de eqüídeos descrita, a temperatura na qual as células espermáticas obtidas dos machos eqüinos são mantidas de acordo com a invenção aumentam o índice de prenhez pode ser entre cerca de 10°C e cerca de 20°C, e pode ser especificamente cerca de 15°C. Vide os exemplos abaixo para a aplicação que envolve eqüídeos. Vide também o Exemplo 8 abaixo que ilustra uma aplicação da invenção na qual as células espermáticas obtidas de um macho de uma espécie de alce são mantidas a cerca de 20°C antes da inseminação de um alce fêmeo.

[039] O sistema para processar células espermáticas da invenção pode incluir ainda transportar as células espermáticas obtidas do macho de uma espécie de mamífero mantidas em temperatura(s) de acordo com a invenção. Tal transporte pode ter uma duração limitada de menos do que uma hora ou pode ter uma duração mais prolongada entre cerca de 1 hora e cerca de 72 horas, ou como descrito, pode ser uma duração de cerca de 18 horas.

[040] A invenção pode incluir ainda a etapa de corar as células espermáticas obtidas de um macho de uma espécie de mamífero, como descrito acima, que foram mantidas em uma temperatura que gera o índice de prenhez mais alto de tais fêmeas da tal espécie de mamífero.

[041] A invenção pode incluir ainda a inseminação histeroscópica ou guiada por via retal da fêmea da espécie de mamífero. Especificamente, como descrito, pela incorporação como referência aqui incluída, a inseminação histeroscópica de mamíferos eqüinos com células espermáticas selecionadas quanto à pré-seleção do sexo, que podem ser manuseadas de acordo com a presente invenção, e pode incluir ainda um baixo número de células espermáticas, comparado com o número de células espermáticas usadas tipicamente para inseminar uma fêmea de uma espécie específica de mamífero, inclusive, porém sem limitações, mamíferos eqüinos.

### **EXEMPLO 2**

[042] O sêmen de oito garanhões foi diluído até cerca de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL em cada um dos quatro diluentes para transporte, como indicado na Tabela 2. Durante o transporte simulado por 18 h, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente ( $20 - 24^\circ\text{C}$ ), exceto aquelas diluídas em INRA96, que foram estocadas a  $15^\circ\text{C}$ . Após a estocagem, as amostras foram centrifugadas a  $600 \times g$  por 10 min e os agregados foram diluídos até  $400 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Depois da incubação a  $19-24^\circ\text{C}$  por 1 h e diluição até  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL, o esperma foi corado a  $34^\circ\text{C}$  com o corante Hoechst 33342  $224 \mu\text{M}$  por 1 h, e depois diluído até  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL em KMT. Para simular as condições de seleção, o esperma foi diluído até 700.000 espermatozoides/mL em HBGM-3 sem BSA e mantido à temperatura ambiente por 1,5 h, antes de centrifugar a  $850 \times g$  por 20 min. A motilidade foi avaliada em quatro ambientes químicos, como indicado na Tabela 2.

Tabela 2

Porcentagem de Espermatozóides Móveis em Amostras  
Estocadas em Quatro Meios de Transporte Diferentes

Meios	Pós- transporte	Pré- coloração	Pós- coloração	Pós- diluição
EZ Mixin CST; Anim. Reprod. Systems , Chino, CA, E.U.A.	59	48 <sup>a,b</sup>	31 <sup>b</sup>	47 <sup>a</sup>
Next Generation; Exodus Breeders, York, PA, E.U.A.	54	40 <sup>b</sup>	27 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>
KMT; <i>J. Am. Sci.</i> 69:3308- 3313 (1991)	64	58 <sup>a</sup>	46 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>
INRA96; IMV Technologies, França	63	53 <sup>a</sup>	43 <sup>a</sup>	54 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Os valores na mesma coluna, sem sobrescritos comuns, diferem( $P < 0,05$ ), Teste de Tukey

[043] Como pode ser entendido a partir dos dados indicados na Tabela 2, KMT e INRA96 mantiveram motilidade mais alta em todo decurso de certos procedimentos para processar células espermáticas.

[044] O sistema para processar células espermáticas da invenção pode incluir ainda a etapa de diluir as células espermáticas obtidas a partir de um macho de uma espécie de mamífero em KMT, e especificamente com relação às células espermáticas obtidas de um macho de uma espécie eqüina de mamífero, KMT pode aumentar significativamente a motilidade das células espermáticas.

[045] O sistema para processar células espermáticas desta invenção pode incluir ainda a etapa de diluir as células espermáticas obtidas a partir de um macho de uma espécie de mamífero em INRA96, e especificamente com relação às células espermáticas obtidas de um macho de uma espécie

equina de mamífero, INRA96 pode aumentar significativamente a motilidade das células espermáticas.

### **EXEMPLO 3**

[046] Os ejaculados de 8 garanhões foram diluídos até  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL em KMT, e alíquotas de 40 mL foram colocadas sob temperaturas de 5, 10, 15, 20 e 25°C por 18 h. As amostras foram então processadas similarmente aos métodos do Exemplo 2. A motilidade foi avaliada com e sem cafeína 2 mM como estimulante. A avaliação citométrica de fluxo da mortalidade percentual foi feita usando coloração com iodeto de propídio.

Tabela 3

Porcentagem de Espermatozoides Móveis Após 18 h em Temperaturas (°C) Variadas (não-estimuladas/estimuladas)

Temperatura	Pós-transporte	Pré-coloração	Pós-coloração	Após Alta Diluição	Mortalidade (%)
5	63 <sup>ab</sup> /63 <sup>ab</sup>	56 <sup>a</sup> /56	49 <sup>a</sup> /49 <sup>a</sup>	45 <sup>a</sup> /50 <sup>ab</sup>	28 <sup>ab</sup>
10	62 <sup>ab</sup> /63 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup> /56	48 <sup>ab</sup> /52 <sup>a</sup>	45 <sup>a</sup> /50 <sup>ab</sup>	26 <sup>ab</sup>
15	65 <sup>a</sup> /64 <sup>a</sup>	56 <sup>a</sup> /54	45 <sup>ab</sup> /51 <sup>a</sup>	45 <sup>a</sup> /51 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>
20	59 <sup>bc</sup> /62 <sup>ab</sup>	54 <sup>ab</sup> /56	42 <sup>b</sup> /48 <sup>ab</sup>	41 <sup>a</sup> /47 <sup>ab</sup>	23 <sup>a</sup>
25	56 <sup>c</sup> /59 <sup>b</sup>	49 <sup>b</sup> /53	35 <sup>c</sup> /43 <sup>b</sup>	35 <sup>b</sup> /44 <sup>b</sup>	31 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Os valores na mesma coluna, sem sobrescritos comuns, diferem ( $P < 0,05$ )

[047] Como indicado na Tabela 3, usar KMT pode reduzir a diferença da motilidade com relação às temperaturas de estocagem ou transporte de 5, 10 ou 15°C.

[048] Assim sendo, o sistema para processar células espermáticas da presente invenção pode incluir ainda a etapa de diluir ou manter tais células espermáticas obtidas do macho da espécie de mamífero em tal concentração

(ou concentrações) de KMT, antes de corar tais células espermáticas com o corante da Hoechst e antes de selecionar por fluxo tais células espermáticas.

#### **EXEMPLO 4**

[049] As células espermáticas em ejaculados de três garanhões foram avaliadas inicialmente quanto ao volume, concentração e motilidade. A parte remanescente dos ejaculados foi diluída com KMT ou EZ Mixin, com 0% de plasma seminal adicional ou 10% de plasma seminal, concentrando até as seguintes concentrações de células espermáticas/corante:  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL, Hoechst 2,6  $\mu\text{L}$ ;  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL, Hoechst 3,9  $\mu\text{L}$ ;  $150 \times 10^6$  espermatozoides/mL, Hoechst 7,8  $\mu\text{L}$ ; ou  $450 \times 10^6$  espermatozoides/mL, Hoechst 23,4  $\mu\text{L}$ ; e processadas imediatamente ou depois de 18 horas de estocagem à temperatura ambiente. As amostras de células espermáticas coradas foram então avaliadas quanto à resolução e morte percentual por análise de citometria de fluxo, e a motilidade foi avaliada diluindo ainda mais 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra de células espermáticas coradas com 140  $\mu\text{L}$  de EZ Mixin ou KMT.

[050] Fazendo agora referência principalmente à Figura 1, pode-se entender que, conforme aumenta a concentração de corante, diminui a motilidade total e progressiva das células espermáticas, e particularmente das células espermáticas eqüinas, a porcentagem de células espermáticas mortas aumenta, e aumenta a capacidade de as técnicas de citometria de fluxo resolverem as células espermáticas portadoras do cromossoma X das células espermáticas portadoras do cromossoma Y.

[051] O sistema para processar células espermáticas desta invenção pode compreender uma faixa de concentrações de corante que proporcionam melhor motilidade total e progressiva de células espermáticas coradas, melhor resolução das células espermáticas portadoras do cromossoma X das células espermáticas portadoras do cromossoma Y, durante a seleção por fluxo, ou menor porcentagem de células espermáticas mortas, comparando

com a faixa de concentração de corante usada na tecnologia convencional com relação a células espermáticas obtidas de uma espécie específica, ou outras faixas de concentrações de corante, conforme descrito. Especificamente para aplicações da invenção em eqüinos, a faixa de concentrações do corante, que pode proporcionar melhor motilidade total ou progressiva, melhor resolução das células espermáticas portadoras do cromossoma X das células espermáticas portadoras do cromossoma Y, durante a seleção por fluxo, ou menor porcentagem de células espermáticas mortas, nas amostras de células espermáticas coradas, pode ser entre cerca de  $50 \times 10^6$  espermatozóides/mL, Hoechst 2,6  $\mu\text{L}$ ;  $50 \times 10^6$  espermatozóides/mL, Hoechst 3,8  $\mu\text{L}$ . Embora os resultados sejam menos favoráveis, a faixa de concentração do corante pode ser entre  $150 \times 10^6$  espermatozóides/mL, Hoechst 7,8  $\mu\text{L}$ , e cerca de  $450 \times 10^6$  espermatozóides/mL, Hoechst 23,4  $\mu\text{L}$ .

[052] Fazendo agora referência principalmente à Figura 2, pode-se entender que as células espermáticas diluídas em KMT permanecem mais móveis com relação às amostras de células espermáticas frescas e amostras de células espermáticas estocadas por um certo tempo à temperatura ambiente, tal como 18 horas à temperatura ambiente.

[053] A invenção pode incluir ainda o uso de KMT como um diluente para aumentar a motilidade total ou progressiva de células espermáticas frescas, de células espermáticas estocadas por um certo tempo, como por exemplo, 18 horas ou mais, ou de células espermáticas que são transferidas ou transportadas de um primeiro local, como por exemplo, o local no qual as células espermáticas são obtidas de um mamífero macho, até um segundo local ou uma pluralidade de locais nos quais ocorre o processamento adicional das células espermáticas obtidas do mamífero macho, tal como a contagem, separação de células espermáticas portadoras do cromossoma X das células espermáticas portadoras do cromossoma Y, ou preparação de

produtos que contêm células espermáticas, inclusive, porém sem limitações, a fabricação de canudos de esperma para inseminação artificial (selecionado ou não), ou um segundo ou uma pluralidade de locais nos quais a inseminação de uma fêmea da espécie de mamífero ocorre, oócitos são fertilizados *in vitro*, ou similares.

### **EXEMPLO 5**

[054] As células espermáticas em ejaculados de três garanhões foram avaliadas inicialmente quanto ao volume, concentração e motilidade. A parte remanescente de cada ejaculado foi diluída em KMT até  $25 \times 10^6$  espermatozóides/mL, e estocada à temperatura ambiente por 18 h. Os ejaculados estocados foram aglutinados por centrifugação a  $600 \times g$  por 10 min. As células espermáticas aglutinadas foram recolocadas em suspensão em KMT com o corante Hoechst, para gerar amostras de espermatozóides com  $400 \times 10^6$  espermatozóides/mL, 12,4 µL de Hoechst, ajustando até pH 7,1 ou pH 7,9, e depois incubadas a 34°C por 30 min ou 60 min. As amostras de células espermáticas coradas foram diluídas com 1 mL de KMT com 1,5 µL do corante alimentício vermelho a 5%; com 1 mL de KMT com 2,0 µL do corante alimentício vermelho a 5%; com 1 mL de KMT com 2,5 µL do corante alimentício vermelho a 5%; ou com 1 mL de KMT com 3,0 µL do corante alimentício vermelho a 5%; ou com 1 mL de KMT com 3,0 µL do corante alimentício vermelho a 2%. As amostras de células espermáticas foram então avaliadas quanto à mortalidade percentual e resolução por análise de citometria de fluxo, e a motilidade foi avaliada diluindo ainda mais as amostras tratadas em 140 µL de KMT: 20 µL de células espermáticas; 140 µL de KMT, cafeína 2 mM: 20 µL de células espermáticas; 140 µL de KMT, piruvato de sódio 2,5 mM: 20 µL de células espermáticas.

Tabela 4

Efeito do Garanhão

	Gunsmoke	Rowdy	Sylekt
--	----------	-------	--------

% de mortalidade	15,5	16	17,13
Resolução	5,81	4,5	5,88

	Gunsmoke	Rowdy	Sylekt
Motilidade 0 h	55	68,44	59,69
Progressiva 0 h	43,13	68,44	56,25
Motilidade 3 h - Nada	63,13	65,94	67,19
Motilidade 3 h - Cafeína	66,25	67,5	69,38
Motilidade 3 h - Piruvato	62,19	67,19	65,94
Progressiva 3 h - Nada	55,94	65,94	63,75
Progressiva 3 h - Cafeína	63,13	67,5	69,06
Progressiva 3 h - Piruvato	56,56	67,19	63,13

Tabela 5

Efeito do pH do Corante

	7,1	7,9
% de mortalidade	17,25	15,17
Resolução	5,58	5,21

	7,1	7,9
--	-----	-----

Motilidade 0 h	62,08	60
Progressiva 0 h	55,83	56,04
Motilidade 3 h - Nada	66,25	64,58
Motilidade 3 h - Cafeína	68,54	66,88
Motilidade 3 h - Piruvato	65,83	64,38
Progressiva 3 h - Nada	62,29	61,46
Progressiva 3 h - Cafeína	67,5	65,63
Progressiva 3 h - Piruvato	63,13	61,46

Tabela 6

## Efeito do Corante Alimentício

	1,5	2	2,5	3
% de mortalidade	16	16,33	16,17	16,33
Resolução	5,33	5,25	5,5	5,5

	1,5	2	2,5	3
Motilidade 0 h	60,42	62,08	62,5	59,17
Progressiva 0 h	55,83	56,67	57,08	54,17
Motilidade 3 h - Nada	64,58	65,42	66,25	65,42

Motilidade 3 h - Cafeína	66,67	68,33	68,75	67,08
Motilidade 3 h - Piruvato	64,58	65	65,83	65
Progressiva 3 h - Nada	61,67	61,67	62,92	61,25
Progressiva 3 h - Cafeína	65,42	67,5	67,92	65,42
Progressiva 3 h - Piruvato	62,08	60,83	64,58	61,67

Tabela 7

Efeito do Tempo de Coloração (somente 12 amostras)

	30 min	60 min
% de mortalidade	14,83	16,17
Resolução	4,92	5,5

	30 min	60 min
Motilidade 0 h	66,25	62,5
Progressiva 0 h	62,08	57,08
Motilidade 3 h - Nada	65,83	66,25
Motilidade 3 h - Cafeína	66,67	68,75

Motilidade 3 h - Piruvato	64,58	65,83
Progressiva 3 h - Nada	62,08	62,92
Progressiva 3 h - Cafeína	65	67,92
Progressiva 3 h - Piruvato	60,42	64,58

Tabela 8  
pH e Tempo de Coloração

	7,1		7,9	
	30 min	60 min	30 min	60 min
% de mortalidade	15,67	17	14	15,33
Resolução	4,83	5,83	5	5,17

	7,1		7,9	
	30 min	60 min	30 min	60 min
Motilidade 0 h	65,83	62,5	66,67	62,5
Progressiva 0 h	61,67	55,83	62,5	58,33
Motilidade 3 h - Nada	65,83	68,33	65,83	64,17
Motilidade 3 h - Cafeína	66,67	70	66,67	67,5
Motilidade 3 h - Piruvato	64,17	67,5	65	64,17
Progressiva 3 h - Nada	63,33	64,17	60,83	61,67

Progressiva 3 h - Cafeína	65	70	65	65,83
Progressiva 3 h - Piruvato	60,83	66,67	60	62,5

Tabela 9

## Estimulantes da Motilidade

	Nenhum	Cafeína	Piruvato
Motilidade em 3 h	65,42	67,71	65,10
Progressiva em 3 h	61,88	66,56	62,29

[055] Fazendo agora referência principalmente à Figura 3, pode-se entender que a coloração de células espermáticas em um pH mais alto pode diminuir a porcentagem de células espermáticas mortas, como se pode avaliar pela análise por citometria de fluxo.

[056] Fazendo agora referência principalmente à Figura 4, pode-se entender que diminuindo o período de incubação para corar as células espermáticas, do período convencional de 60 min para um período de 30 min, pode-se diminuir a porcentagem de células espermáticas mortas, e aumentar a resolução de células espermáticas portadoras do cromossoma X das células espermáticas portadoras do cromossoma Y, durante a citometria de fluxo.

[057] Fazendo agora referência principalmente à Figura 5, pode-se entender que a adição de um estimulante, tal como cafeína, em uma

concentração cerca de 2 mM, pode estimular a motilidade nas células espermáticas, e pode ser particularmente eficaz em estimular células espermáticas eqüinas estressadas.

[058] Assim sendo, a invenção pode incluir ainda a etapa de ajustar o pH da solução na qual as células espermáticas obtidas do macho de uma espécie de mamífero são coradas com um fluorocromo, tal como o Hoechst. O pH da solução do corante pode ser elevado até um pH entre cerca de pH 7,2 e cerca de pH 8,0, para seleccionar o pH desejado para uma amostra de células espermáticas específicas ou até um pH que gera uma percentagem reduzida ou mínima de células mortas em um tipo específico de amostra de células espermáticas coradas. Especificamente, com relação às células espermáticas obtidas de machos eqüinos, o pH da solução do corante pode ser elevado até entre cerca de pH 7,5 e cerca de pH 8,0, e especificamente, pode ser pH 7,9, para reduzir a percentagem de células espermáticas eqüinas mortas em amostras de células espermáticas coradas.

[059] A invenção pode incluir ainda a etapa de reduzir o tempo em que as células espermáticas são incubadas na solução de corante, para reduzir a percentagem de mortalidade em amostras de células espermáticas coradas, ou para aumentar a motilidade, ou aumentar a resolução de esperma corado portador de cromossoma X do esperma corado portador do cromossoma Y, quando seleccionado por fluxo ou separado de outra forma, baseado no teor do DNA. Dependendo da aplicação na qual a invenção é empregada, o tempo em que as células espermáticas são expostas à solução do corante, ou incubadas na solução do corante, ou colocadas de outra forma em suspensão na solução do corante, pode ser reduzido substancialmente. A redução no tempo pode ser de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% ou mais, do tempo usado tipicamente; ou pode ser uma redução no tempo que reduz o número de células espermáticas mortas resultantes da coloração com um fluorocromo, sem uma redução significativa na resolução durante a seleção por fluxo; ou

pode ser uma redução no tempo que resulta em maior resolução durante a seleção por fluxo sem um aumento significativo na porcentagem de células espermáticas mortas, na amostra corada. A quantidade de tempo que uma amostra de células espermáticas eqüinas, por exemplo, incuba em uma solução do corante Hoechst (como descrito acima), pode ser entre cerca de 25 min e cerca de 50 min, para obter maior resolução da seleção por fluxo ou menor porcentagem de células espermáticas mortas, e pode ser especificamente 30 min. A redução real no tempo pode ser determinada para proporcionar um equilíbrio desejado ente motilidade, porcentagem de células espermáticas mortas, e resolução para seleção por fluxo, dentro de uma população de células espermáticas próxima da hora de estarem coradas.

[060] A invenção pode incluir ainda a etapa de adicionar um estimulante à amostra de células espermáticas. O estimulante pode ser cafeína, ou um estimulante similar à cafeína, ou um estimulante que aumenta a motilidade das células espermáticas ou outra função ou característica das células espermáticas, seja mecânica ou fisiológica. O estimulante pode ser adicionado antes ou depois que a célula espermática é exposta a uma etapa do processo, tal como estocagem, transporte, diluição, seleção por fluxo, inseminação, ou etapa similar. Especificamente, uma concentração entre aproximadamente 1 mM e aproximadamente 5 mM de cafeína pode ser usada, e especificamente, com relação a células espermáticas eqüinas, pode-se usar uma concentração de cafeína 2 mM.

### **EXEMPLO 6**

[061] Os ejaculados de dez garanhões foram avaliados inicialmente quanto ao volume, e concentração e motilidade das células espermáticas. A parte remanescente de cada ejaculado foi diluída em KMT preparado usando  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  (KMT), ou KMT preparado usando  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (KMT modificado) até  $25 \times 10^6$  espermatozóides/mL, e estocada a 5°C, 10°C, 15°C, 20°C e 25°C por 18 h. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de células espermáticas tratadas foi então

diluída com 100  $\mu\text{L}$  de KMT ou 100  $\mu\text{L}$  de KMT com cafeína 4 mM, e a motilidade das células espermáticas foi avaliada. A parte remanescente das células espermáticas tratadas em cada amostra foi centrifugada a 600 x g por 10 min, o sobrenadante foi aspirado até cerca de 0,75 mL e as células espermáticas aglutinadas foram recolocadas em suspensão nesse volume. A motilidade das células espermáticas tratadas após a centrifugação foi avaliada após diluição de 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra com 520  $\mu\text{L}$  de KMT ou 520  $\mu\text{L}$  de KMT com cafeína 2 mM.

[062] Aliquotas de  $200 \times 10^6$  espermatozóides/mL, 12,4 L de Hoechst, de cada grupo de tratamento tiveram seu pH ajustado para 7,1 e incubadas a 34°C por 60 min. As amostras de células espermáticas coradas foram estendidas com 1 mL de KMT com 1,5  $\mu\text{L}$  de corante alimentício vermelho a 5%. As amostras de alta diluição foram então preparadas pela adição de 3 mL de KMT ou 3 mL de KMT modificado e 22 mL de HBGM-3 5 mM a 175  $\mu\text{L}$  de esperma corado (a  $100 \times 10^6$  espermatozóides/mL).

[063] As amostras de células espermáticas tratadas foram então avaliadas quanto à mortalidade percentual e resolução por análise de citometria de fluxo, e a motilidade foi avaliada diluindo ainda mais as amostras tratadas em 140  $\mu\text{L}$  de KMT: 20  $\mu\text{L}$  d células espermáticas; ou 140  $\mu\text{L}$  de KMT, cafeína 2 mM: 20  $\mu\text{L}$  de células espermáticas.

Tabela 10  
Efeito do Garanhão

	Pship	Pcent	Pstain	Hdil	% mortas	resolução
A	63,3	52,5	44,5	47,5	22,8	5,7
B	54,5	50,8	32,3	31,8	41,1	8,2
C	68,8	62,8	55,6	44,1	21,4	6,2
D	64,7	58,4	46,6	48,4	26,1	7,3

E	65,3	57,8	48,8	45,5	21,6	5,2
G	58,8	58	63,8	37	30,7	7
H	58	51,5	48,5	46,5	25,2	8
J	58	50	41,8	41,8	17,9	6,8

Tabela 11

Efeito do Diluente

	Pship	Pcent	Pstain	Hdil	% mortas	resolução
KMT	60,7	52,8	42,8	40,9	26,6	6,8
KMT Modificado	61,6	57,1	45,2	44,4	25,5	6,8

Tabela 12

Efeito da Temperatura de Transporte

	Pship	Pcent	Pstain	Hdil	% mortas	resolução
5	62,5	56,1	48,8	45	27,9	6,9
10	62	58	47,5	44,7	26,4	6,8
15	64,7	56,3	44,5	44,8	23,1	6,7
20	59,2	53,6	42,2	41,4	23,3	6,6
25	55,8	49,4	34,6	35,4	31,4	7,2

Tabela 13

Motilidade Após Transporte

	Total	Progressiva	Estimulada	T Estimulada e Progressiva

5	62,5	59,2	62,5	61,4
10	62	58,9	63,3	61,9
15	64,7	62,7	64,2	62,7
20	59,2	59,1	62,3	61,1
25	55,8	55	59	57,9

Tabela 14

## Motilidade Após Centrifugação

	Total	Progressiva	Estimulada	T Estimulada e Progressiva
5	56,1	55,6	56,3	55,2
10	58	56,3	56,4	54,4
15	56,3	56,1	53,6	52,2
20	53,6	52,8	56,4	55,6
25	49,4	48,5	52,7	51,9

Tabela 15

## Motilidade Após Coloração

	Total	Progressiva	T Estimulada e progressiva	Estimulada
5	48,8	48,6	49,1	49,1
10	47,5	47,2	52	51,9
15	44,5	44,5	51,4	51,3
20	42,2	42,2	48,1	47,5
25	34,6	34	42,7	42,7

Tabela 16

## Motilidade Após Alta Diluição

	Total	Progressiva	Estimulada	T Estimulada e Progressiva
5	45	45	49,5	49,5
10	44,7	44,1	49,5	48,9
15	44,8	44,8	51,1	51,1
20	41,4	40,5	46,9	46,9
25	35,4	36,9	44,4	43,3

Tabela 17

## Percentual de Mortalidade e Resolução

	% Mortalidade	Resolução
5	27,9	6,9
10	26,4	6,8
15	23,1	6,7
20	23,3	6,6
25	31,4	7,2

Tabela 18

## Motilidade Após Transporte

(KMT versus KMT Modificado)

	KMT	KMT Modificado
5	62,8	62,2
10	61,9	62,2

15	63,4	65,9
20	57,8	60,6
25	56,3	55,4

Tabela 19

Motilidade Após Alta Diluição

(KMT versus KMT Modificado)

	KMT	KMT Modificado
5	42,8	47,2
10	44,4	45
15	43,1	46,6
20	40	42,8
25	31,7	39,2

Tabela 20

Mortalidade Percentual

(KMT versus KMT Modificado)

	KMT	KMT Modificado
5	27,5	28,4
10	26,4	26,5
15	23,3	23
20	23	23,6
25	36,8	26

[064] Fazendo agora referência principalmente à Figura 6, a motilidade total e a motilidade progressiva das células espermáticas

apresentam resultados ao usar KMT modificado preparado usando  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

[065] Fazendo agora referência à Figura 7, pode-se entender que a motilidade total e a motilidade progressiva das células espermáticas após etapas do processo, tais como coloração para seleção por fluxo e etapas nas quais as células espermáticas são diluídas, podem não ser aumentadas usando KMT modificado preparado usando  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , sejam ou não as células espermáticas expostas a um estimulante tal como a cafeína.

[066] Fazendo agora referência principalmente à Figura 8, pode-se entender que a temperatura pode ser ajustada para estocagem, manuseio, transferência, ou transporte de células espermáticas obtidas de um macho de uma espécie de mamífero, para aumentar a motilidade total de progressiva. Com relação a algumas células espermáticas de certas espécies de mamíferos, a estocagem, o manuseio, a transferência ou o transporte a cerca de  $15^\circ\text{C}$  pode manter altos níveis de motilidade total ou progressiva de células espermáticas ou células espermáticas estimuladas.

[067] Fazendo agora referência à Figura 9, pode-se entender que a temperatura na qual as células espermáticas são transferidas, estocadas ou manuseadas antes de um protocolo de coloração, tal com descrito acima, pode ser ajustada para aumentar a motilidade total ou progressiva das células espermáticas, ou células espermáticas estimuladas, ou células espermáticas estimuladas com cafeína. Com relação a certas modalidades da invenção, incluindo aquelas nas quais células espermáticas eqüinas são processadas, as temperaturas de estocagem, transferência, ou transporte, entre cerca de  $5^\circ\text{C}$  e cerca de  $20^\circ\text{C}$  podem aumentar a motilidade total e progressiva das células espermáticas. Além disso, com relação às células espermáticas estimuladas, processadas de acordo com a invenção, inclusive aquelas modalidades da invenção nas quais células espermáticas eqüinas são estimuladas com cafeína, as temperaturas de manuseio, estocagem ou transferência, entre  $5^\circ\text{C}$

e cerca de 20°C também podem aumentar a motilidade total e progressiva. Especificamente, as modalidades da invenção usadas para processar células espermáticas eqüinas estimuladas compreendem temperaturas entre cerca de 10°C e cerca de 15°C, para manusear, estocar ou transferir células espermáticas eqüinas estimuladas.

[068] Fazendo referência agora à Figura 10, pode-se entender que a temperatura na qual as células espermáticas são transferidas, estocadas ou manuseadas, antes de um processo de coloração, tal como descrito acima, pode ser ajustada para aumentar a motilidade total ou progressiva de células espermáticas, ou células espermáticas estimuladas, ou células espermáticas estimuladas com cafeína, subseqüentemente a um protocolo de coloração. Com relação a certas modalidades da invenção, inclusive aquelas nas quais células espermáticas eqüinas são processadas, as temperaturas de estocagem, transferência ou transporte, entre cerca de 5°C e cerca de 20°C podem aumentar a motilidade total e progressiva de células espermáticas subseqüentemente a protocolos de coloração. Além disso, com relação a células espermáticas estimuladas, processadas de acordo com a invenção, inclusive aquelas modalidades da invenção que incluem células espermáticas estimuladas com cafeína, as temperaturas de manuseio, estocagem ou transferência entre 5°C e cerca de 20°C também podem aumentar a motilidade total e progressiva. Especificamente, as modalidades da invenção usadas para processar células espermáticas eqüinas estimuladas compreendem temperaturas entre cerca de 10°C e cerca de 15°C para manusear, estocar ou transferir células espermáticas eqüinas estimuladas.

[069] Fazendo agora referência à Figura 11, pode-se entender que a porcentagem de células mortas após a coloração, como descrito acima, pode ser reduzida estocando ou transportando as células espermáticas a 15°C.

### **EXEMPLO 7**

[070] Os ejaculados de doze garanhões foram avaliados inicialmente quanto ao volume, e concentração e motilidade das células espermáticas. A parte remanescente de cada ejaculado foi diluída em KMT até  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e estocada a  $15^\circ\text{C}$  por 18 h. A motilidade após estocagem foi avaliada usando alíquotas de  $100 \mu\text{L}$  de células espermáticas tratadas e depois diluídas com  $100 \mu\text{L}$  de KMT, e cafeína  $4 \text{ mM}$ . A parte remanescente das células espermáticas tratadas em cada amostra foi centrifugada a  $600 \times g$  por 10 min, o sobrenadante foi aspirado até cerca de  $1,50 \text{ mL}$  e as células espermáticas aglutinadas foram recolocadas em suspensão nesse volume. As células espermáticas tratadas foram diluídas até  $400 \times 10^6$  espermatozoides/mL e as alíquotas foram transferidas para um tubo de coloração para tratamento da seguinte maneira:

1.  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL,  $8,68 \mu\text{L}$  de Hoechst, pH 7,1, incubadas a  $34^\circ\text{C}$  por 60 min
2.  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL,  $10,54 \mu\text{L}$  de Hoechst, pH 7,1, incubadas a  $34^\circ\text{C}$  por 60 min
3.  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL,  $12,44 \mu\text{L}$  de Hoechst, pH 7,1, incubadas a  $34^\circ\text{C}$  por 60 min
4.  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL,  $8,68 \mu\text{L}$  de Hoechst, pH 7,1, incubadas a  $34^\circ\text{C}$  por 30 min
5.  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL,  $10,54 \mu\text{L}$  de Hoechst, pH 7,1, incubadas a  $34^\circ\text{C}$  por 30 min
6.  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL,  $12,44 \mu\text{L}$  de Hoechst, pH 7,1, incubadas a  $34^\circ\text{C}$  por 30 min
7.  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL,  $4,34 \mu\text{L}$  de Hoechst, pH 7,1, incubadas a  $34^\circ\text{C}$  por 60 min
8.  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL,  $5,27 \mu\text{L}$  de Hoechst, pH 7,1, incubadas a  $34^\circ\text{C}$  por 60 min

9.  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, 6,22  $\mu$ L de Hoechst, pH 7,1, incubadas a 34 °C por 60 min

10.  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, 4,34  $\mu$ L de Hoechst, pH 7,1, incubadas a 34 °C por 30 min

11.  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, 5,27  $\mu$ L de Hoechst, pH 7,1, incubadas a 34 °C por 30 min

12.  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, 6,22  $\mu$ L de Hoechst, pH 7,1, incubadas a 34 °C por 30 min

[071] Cada amostra de células espermáticas coradas foi diluída até  $75 \times 10^6$  espermatozoides/mL com KMT, e 0,75  $\mu$ L/mL de corante alimentício vermelho a 5%. Amostras de alta diluição foram então preparadas pela adição de 3 mL de KMT e 22 mL de HBGM-3 5 mM a 234  $\mu$ L da amostra de células espermáticas coradas (a  $75 \times 10^6$  espermatozoides/mL). Cada amostra de células espermáticas coradas foi então avaliada quanto à porcentagem de células mortas e resolução por análise de citometria de fluxo, e a motilidade foi avaliada em KMT e KMT com cafeína 2 mM.

[072] As amostras de alta diluição foram então preparadas pela adição de 3 mL de KMT e 22 mL de HBGM-3 5 mM a 234  $\mu$ L da amostra de células espermáticas coradas (a  $75 \times 10^6$  espermatozoides/mL), e incubadas à temperatura ambiente por cerca de 1,5 h. As amostras de células espermáticas com alta diluição foram então avaliadas quanto a motilidade em KMT e KMT com cafeína 4 mM.

[073] Fazendo agora referência principalmente à Figura 12, pode-se entender que as células espermáticas permanecem mais viáveis quando a concentração de células espermáticas é de cerca de 100 M/mL versus 200 M/mL, sem perda de resolução.

[074] Certas modalidades do sistema para processar células espermáticas da invenção podem incluir ainda a etapa de diluir as células espermáticas obtidas de um macho de uma espécie de mamífero até entre

cerca de 75 M/mL e 200 M/mL, para obter uma concentração de células espermáticas que reduz, minimiza, ou na qual a mortalidade percentual na amostra após coloração não diminui com o aumento maior na diluição das células espermáticas. Especificamente, com relação a algumas modalidades da invenção, a concentração de células espermáticas pode ser menor do que 200 M/mL e em relação às células espermáticas eqüinas, ela pode ser de cerca de 100 M/mL, para reduzir o número de células mortas, como avaliado por citometria de fluxo subseqüentemente ao procedimento de coloração descrito acima.

[075] Fazendo agora referência principalmente à Figura 13, pode-se entender que, conforme aumenta a concentração de corante, menos células espermáticas sobrevivem e a resolução aumenta.

[076] Fazendo agora referência principalmente à Figura 14, pode-se entender que o tempo de coloração pode ser diminuído substancialmente sem perda de resolução entre populações de células espermáticas portadoras do cromossoma X e portadoras do cromossoma Y, avaliado por citometria de fluxo.

[077] Assim sendo, modalidades da invenção podem incluir ainda a etapa de diminuir a concentração de corante usada no protocolo de coloração descrito acima até que a mortalidade percentual nas amostras de células espermáticas coradas não diminua mais substancialmente, e podem incluir ainda a etapa de diminuir a concentração de corante usada até que a resolução das células em fluxo portadoras do cromossoma X e portadoras do cromossoma Y produza uma amostra de células espermáticas selecionadas com menos do que 60% de pureza; ou menos do que a pureza percentual necessária ou desejada, tal como 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% ou 98%; ou menos do que aquela que pode ser atingida para células espermáticas dessa espécie de mamífero macho; ou não menos do que a da seleção por fluxo de uma ou ambas entre

as portadoras do cromossoma X e portadoras do cromossoma Y, em uma taxa de seleção não menor do que entre cerca de 500 seleções/segundo e cerca de 1.000 seleções/segundo, entre cerca de 750 seleções/segundo e cerca de 1.250 seleções/segundo; entre cerca de 1.000 seleções/segundo e cerca de 1.500 seleções/segundo; entre cerca de 1.250 seleções/segundo e cerca de 1.750 seleções/segundo; entre cerca de 1.500 seleções/segundo e cerca de 2.000 seleções/segundo; entre cerca de 1.750 seleções/segundo e cerca de 2.250 seleções/segundo; entre cerca de 2.000 seleções/segundo e cerca de 2.500 seleções/segundo; entre cerca de 2.250 seleções/segundo e cerca de 2.750 seleções/segundo; entre cerca de 2.500 seleções/segundo e cerca de 3.000 seleções/segundo; entre cerca de 2.750 seleções/segundo e cerca de 3.250 seleções/segundo; entre cerca de 3.000 seleções/segundo e cerca de 3.500 seleções/segundo; entre cerca de 3.250 seleções/segundo e cerca de 3.750 seleções/segundo; entre cerca de 3.500 seleções/segundo e cerca de 4.000 seleções/segundo; entre cerca de 3.750 seleções/segundo e cerca de 4.250 seleções/segundo; entre cerca de 4.000 seleções/segundo e cerca de 4.500 seleções/segundo; entre cerca de 4.250 seleções/segundo e cerca de 4.750 seleções/segundo; entre cerca de 4.500 seleções/segundo e cerca de 5.000 seleções/segundo.

### **EXEMPLO 8**

#### Inseminação de Alce Fêmeo com Sêmen Sexuado Congelado

[078] Alces fêmeos com 3 a 6 anos de idade no Colorado e Minnesota foram sincronizados quanto ao estro em setembro pela inserção de um CIDR de progesterona dentro da vagina por 12 a 14 dias. Após a remoção do CIDR, administrou-se 200 UI de eCG por via intramuscular, e os alces fêmeos foram inseminados temporalmente 60 h depois. Sêmen fresco foi coletado por 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 para o laboratório de seleção de espermatozóides. O ejaculado foi

concentrado até  $1 \times 10^9$  espermatozoides/mL para isolamento de cepas por centrifugação de alíquotas de 1,5 mL por 10 s a 15.000 x g. O sêmen foi incubado em Hoechst 33342  $112 \mu\text{M}$   $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL em um meio TALP por 45 min a  $34^\circ\text{C}$ , e depois diluído até  $100 \times 10^6$ /mL para seleção. Os espermatozoides foram selecionados baseado no teor diverso do DNA do esperma portador de cromossoma 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 espermatozoides foram selecionados por fluxo em um período de 4 h, usando MoFlo<sup>®</sup>SX, operando a 0,345 MPa (50 psi) com um líquido prepucial baseado em TRIS. As bandas 351 e 364 de um laser de argônio, emitindo 150 mW, excitaram o corante Hoechst 33342 ligado ao DNA. Os espermatozoides portadores de cromossomas X e também Y foram coletados (~92% de pureza, verificado re-analisando quanto ao DNA as alíquotas espermáticas submetidas a ultra-som) a ~4.700 espermatozoides/segundo dentro de tubos contendo 2 mL de diluente de 20% de gema de ovo em TRIS. Volumes selecionados de 15 mL foram coletados sequencialmente. Aproximadamente  $110 \times 10^6$  espermatozoides de cada sexo foram selecionados e resfriados até  $5^\circ\text{C}$  em 90 min. Um volume igual de glicerol (12%), contendo diluente, foi adicionado ao volume selecionado a  $5^\circ\text{C}$ . As alíquotas de espermatozoides selecionados, contendo 30 mL, foram concentradas por centrifugação a  $4^\circ\text{C}$  por 20 min a 850 x g. Os agregados espermáticos foram selecionados, ajustados para  $21,7 \times 10^6$  espermatozoides/mL e carregados em canudos de 0,25 mL. Cada canudo, contendo um total de  $5 \times 10^6$  espermatozoides, foi congelado em vapor de nitrogênio líquido. Como controle, um total de  $5 \times 10^6$  espermatozoides do mesmo ejaculado foi congelado em canudos de 0,25 mL na mesma hora que o esperma sexuado. Depois de descongelar por 30 s a  $37^\circ\text{C}$ , 65% e 60% do esperma (controle e sexuado, respectivamente) estavam progressivamente móveis, como se pôde determinar por estimativas visuais. Fêmeas em 3

locais e esquemas de manejo diferentes foram inseminadas usando deposição seminal transcervical rotineira no corpo uterino. A prenhez foi determinada 40 dias após a inseminação analisando o sangue quanto à Proteína B Específica de Prenhez (Bio Tracking, Moscow, Idaho, E.U.A.). Dez fêmeas em um local estavam em má condição na hora da inseminação e nenhuma prenhez foi conseguida com o esperma sexuado ou do controle. O índice de prenhez nos outros locais com esperma sexuado (61%; 11/18) foi similar àquele dos inseminados de controle (50%; 3/6). Estes índices de prenhez (sexuados e controles) resultaram de menos espermatozoides do que são usados na inseminação artificial normal de alces fêmeos. Nove entre onze (82%) dos filhotes sexuados foram do sexo previsto.

[079] A invenção pode incluir ainda um mamífero produzido de acordo com qualquer uma das modalidades da invenção descritas 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, tendo uma população enriquecida de células espermáticas portadoras do cromossoma X ou uma 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 espermáticas para inseminação, contendo um baixo número de células espermáticas, comparado com o número típico usado para inseminar essa espécie de mamífero, a progênie de alce produzida de acordo com a invenção, como descrito acima.

[080] Como pode ser facilmente entendido a partir da descrição precedente, os conceitos básicos da presente invenção podem ser incorporados através de uma série de maneiras. Ela envolve um sistema pra processar células espermáticas, inclusive 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 demonstrados 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 pretendidos e descritos. 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. O importante é que, quanto à descrição precedente, todas essas facetas devem ser entendidas como estando englobadas por este relatório descritivo.

[081] A discussão incluída neste pedido de patente não-provisória pretende servir como uma descrição básica. O leitor deve ficar ciente que a discussão específica pode não descrever explicitamente todas modalidades possíveis; muitas alternativas são implícitas. Ela pode também não explicar inteiramente a natureza genérica da invenção e podem não indicar explicitamente como cada característica ou elemento pode ser realmente representativo de uma função mais ampla ou de uma grande variedade de elementos alternativos ou equivalentes. Novamente, eles estão implicitamente incluídos nesta descrição. 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 processo e método podem ser incluídas para realizar as funções que a invenção e cada elemento realiza. Não se retende que nem a descrição nem a terminologia limitem o âmbito da invenção.

[082] Além disso, cada um dos vários elementos da invenção e das reivindicações pode ser alcançado de várias maneiras. Este relatório descritivo deve ser entendido como englobando cada uma dessas 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 deles. Particularmente, deve-se entender que, como a descrição refere-se a elementos da invenção, as palavras para cada elemento podem ser expressas por termos de aparelhos ou termos de métodos equivalentes - mesmo se somente a função ou o resultado é o mesmo. Estes 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 para a qual a invenção se intitula. Como apenas um exemplo, deve-se entender que todas ações podem ser expressas como um meio para empreender essa ação ou como um elemento que causa a ação. Similarmente, cada elemento físico descrito deve ser entendido como englobando uma descrição da ação que este elemento físico possibilita. Quanto a este último aspecto, como apenas um exemplo, a descrição de um "selecionador por fluxo" deve ser entendida como englobando a descrição do ato de "selecionar por fluxo" - seja ou não explicitamente discutido - e, inversamente, caso haja uma descrição efetiva 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 ser entendidos como estando explicitamente incluídos na descrição.

[083] 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 incorporadas como referência. Além disso, quanto a cada termo utilizado, deve-se entender que, a menos que sua utilização neste pedido de patente seja inconsistente com tal interpretação, as definições comuns nos dicionários devem ser entendidas como sendo incorporadas para cada termo e todas definições, termos alternativos, e sinônimos, tais como contidos no "Random House Webster's

Unabridged Dictionary", segunda edição, são aqui incorporados como referência.

[084] Assim sendo, a Requerente deve ser entendida como reivindicando pelo menos: (i) cada um dos dispositivos para processamento de células espermáticas aqui revelados e descritos; (ii) os métodos relacionados revelados e descritos; (iii) variações similares, equivalentes, e mesmo implícitas, de cada um destes dispositivos e métodos; (iv) aqueles desenhos alternativos que realizam cada uma das funções ilustradas conforme reveladas e descritas; (v) aqueles desenhos e métodos alternativos que realizam cada uma das funções ilustradas, conforme sejam implícitas para realizar o que está revelado e descrito; (vi) cada característica, componente, e etapa ilustrada como invenções separadas e independentes; (vii) as aplicações aperfeiçoadas pelos vários sistemas ou componentes descritos; (viii) os produtos resultantes produzidos por tais sistemas ou componentes; e (ix) métodos e aparelhos substancialmente como aqui anteriormente descritos e fazendo referência a qualquer um dos exemplos apresentados; (x) as várias combinações e permutações de cada um dos elementos descritos; e (xi) cada reivindicação ou conceito potencialmente dependente, conforme 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 somente dependências iniciais. Deve-se entender que existe fundamento até o grau necessário sob legislação de fatos novos, incluindo, porém sem limitações, o Artigo 123(2) da "European Patent Convention", e do Título 35 do Código dos Estados Unidos da América do Norte 132 da Lei de Patentes dos Estados Unidos, para permitir a adição de qualquer uma das dependências ou outros elementos apresentados sob uma reivindicação ou conceito independente,

como dependências ou elementos sob qualquer outra reivindicação ou conceito independente. Além disso, caso ou quando utilizado, o uso do verbo transitivo "compreender" é para manter neste caso as reivindicações "em aberto", 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, assinalados, 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 lata, de modo a proporcionar à Requerente a cobertura mais ampla legalmente permissível.

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método para separar células espermáticas, **caracterizado por** compreender:

Resfriar ditas células espermáticas obtidas de um mamífero a uma temperatura de 15°C antes de corar ditas células espermáticas, em que dito mamífero compreende um equino ou bovino;

Corar ditas células espermáticas com corante Hoechst 33342 em uma temperatura entre 30 °C a 39°C;

Determinar uma característica de sexo de uma pluralidade de ditas células espermáticas;

Separar dita pluralidade de células espermáticas com base em dita característica de sexo em uma população tendo cromossomo X e uma população tendo cromossomo Y; e

Coletar pelo menos uma de dita população tendo cromossomo X e dita população tendo cromossomo Y.

2. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ainda compreender resfriar ditas células espermáticas antes de corar a uma temperatura acima da qual lipídeos da membrana de célula espermática passam de uma fase líquida à fase gel.

3. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** dita espécie de mamíferos ser selecionada do grupo consistindo de uma espécie bovina de mamífero, uma espécie equina de mamífero, uma espécie de ovinos de mamífero, uma espécie suína, uma espécie canina de mamífero, uma espécie felina de mamífero, uma espécie de cervos de mamífero, uma espécie de alces de mamífero, e uma espécie marinha de mamífero.

4. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** dita espécie de mamífero compreender uma espécie de equino e em que incubar ditas células espermáticas a dita temperatura acima da qual ditos lipídeos de células espermáticas passam DAE dita fase líquida a dita fase gel compreende incubar ditas células espermáticas a 15°C.

5. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** incubar ditas células espermáticas a dita temperatura acima da qual ditos lipídeos da membrana da célula espermática passam da dita fase líquida para dita fase gel compreende incubar ditas células espermáticas em dita temperatura acima cujos lipídeos de membrana da célula espermática passam de dita fase líquida para dita fase gel entre uma hora a 18 horas.

6. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ainda compreender transportar ditas células espermáticas de uma primeira localização a uma segunda localização durante incubação de ditas células espermáticas a uma temperatura acima da qual ditos lipídeos da membrana da célula espermática passam de dita fase líquida para dita fase gel.

7. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ainda compreender adicionar um antibacteriano a ditas células espermáticas antes de incubar ditas células espermáticas a dita temperatura acima da qual ditos lipídeos de membrana de célula espermática passam de dita fase líquida para dita fase gel.

8. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ainda compreender estender células espermáticas com um extensor.

9. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ainda compreender concentrar ditas células espermáticas por remoção de uma porção de plasma seminal.

10. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** corar ditas células espermáticas compreender corar DNA contido dentro de ditas células espermáticas.

11. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** separar ditas células espermáticas com base em ditas características de célula espermática compreende separar ditas células espermáticas usando um instrumento selecionado do grupo consistindo de um citômetro de fluxo, e um selecionador de célula.

12. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** dito extensor ser selecionado de um grupo consistindo de extensor de leite desnatado-glicose a base de Tyrode, e Tyrodes modificados de Kenney.

13. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ainda compreender adicionar um estimulante a ditas células espermáticas, dito estimulante consistindo de cafeína.

14. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ainda compreender estabelecer um pH de uma solução corante de entre 7,2 pH e 8,0 pH.

15. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** corar ditas células espermáticas com corante Hoechst 33342 compreender corar ditas células espermáticas com 12,4 µL de Hoechst em um pH de 7,9 por um período de 30 minutos.

16. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ainda compreender:

Ajustar dita temperatura na qual ditas células espermáticas são resfriadas a 15°C; e

Aumentar motilidade total ou progressiva de ditas células espermáticas.

17. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** resfriar ainda compreender a etapa de resfriar ditas células espermáticas a uma temperatura de 15°C por um período de 4 horas.

18. Método para separar células espermáticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** corar ditas células espermáticas com corante Hoechst 33342 ocorre a uma temperatura entre 32°C a 35°C.

10/11

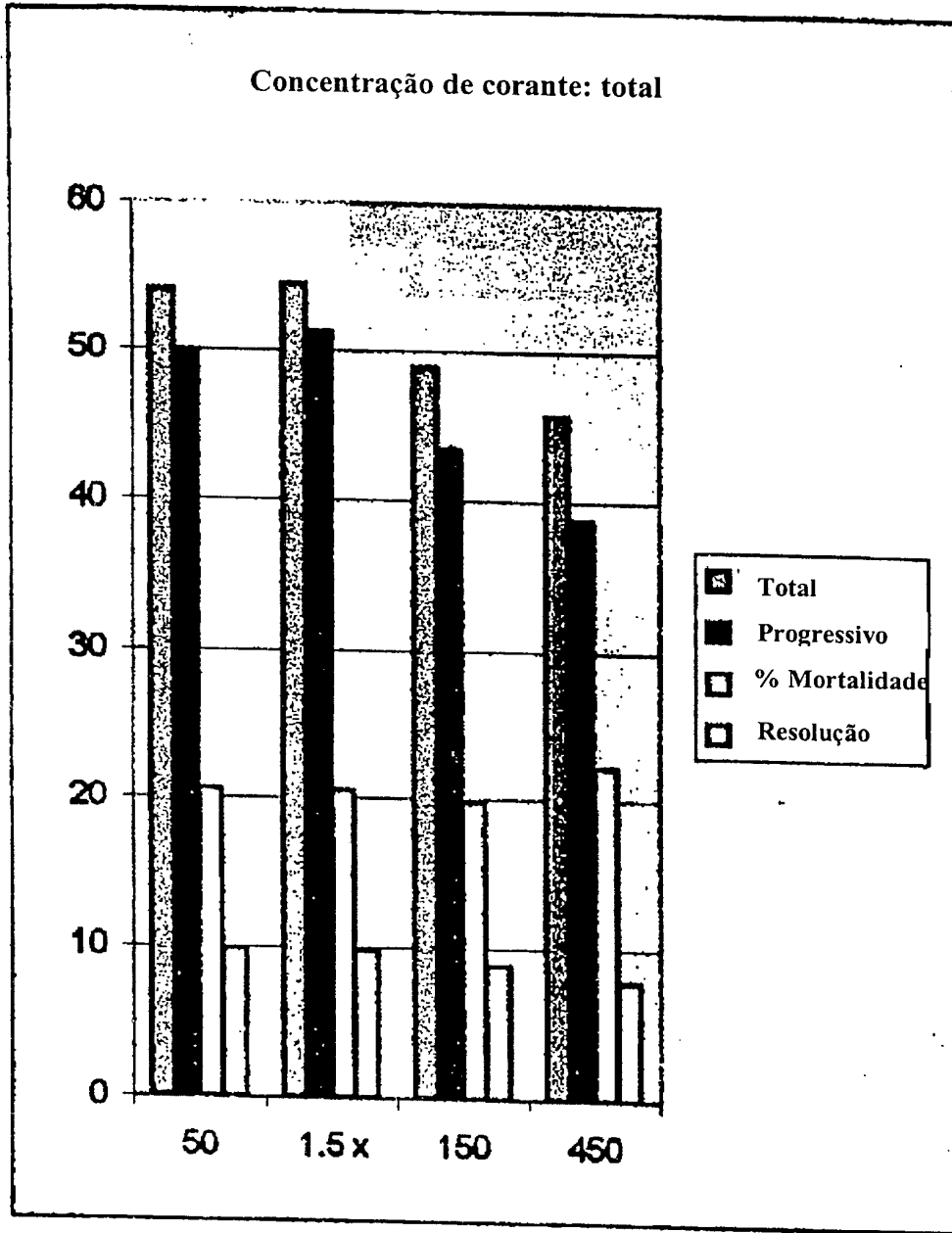


FIG.1

ADK

2/14

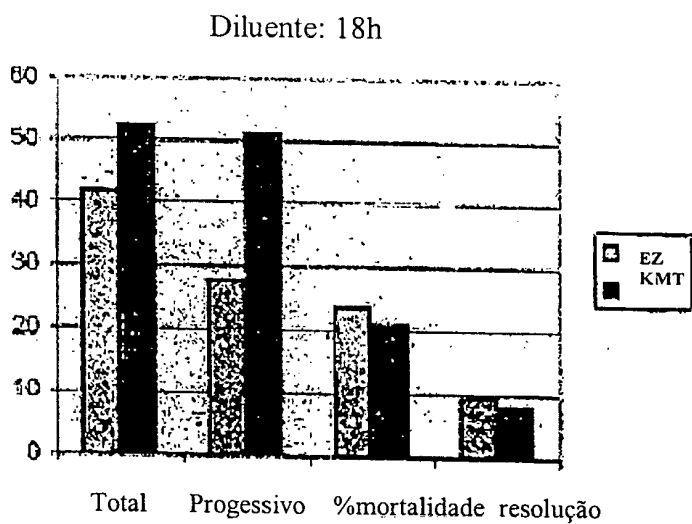
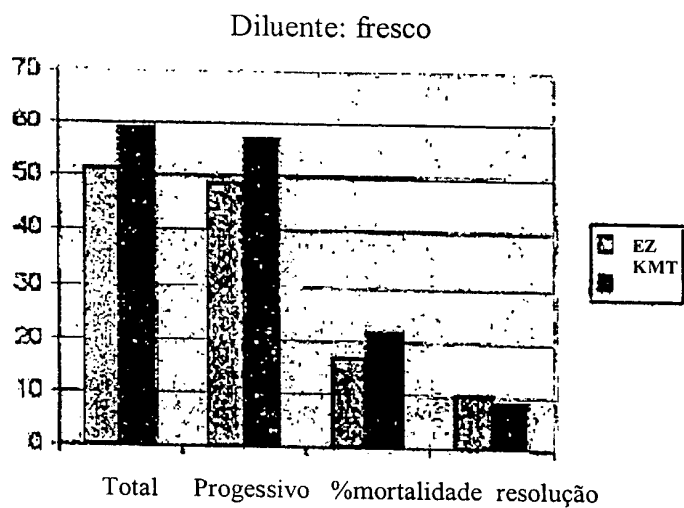


FIG. 2

103  
A.

Efeito do pH do corante: Global

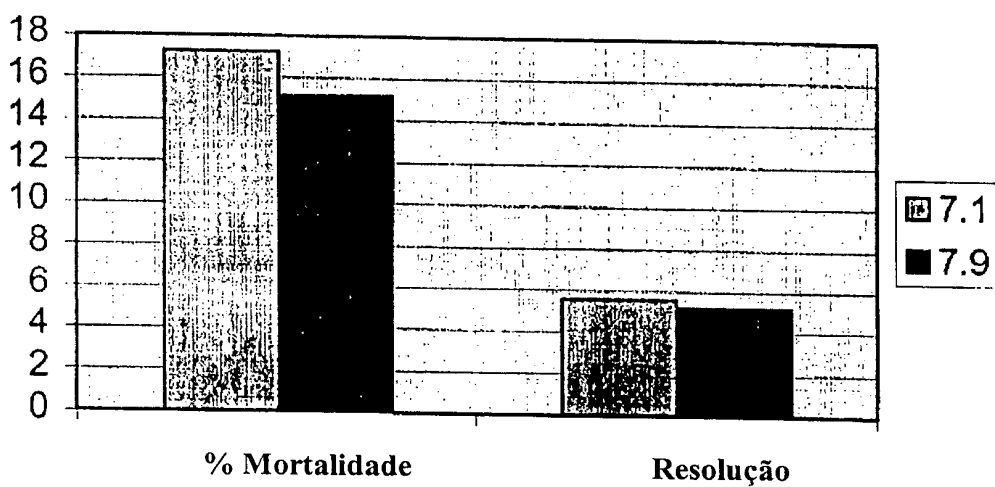


FIG.3

109  
R.

Tempo de coloração: 12 amostras

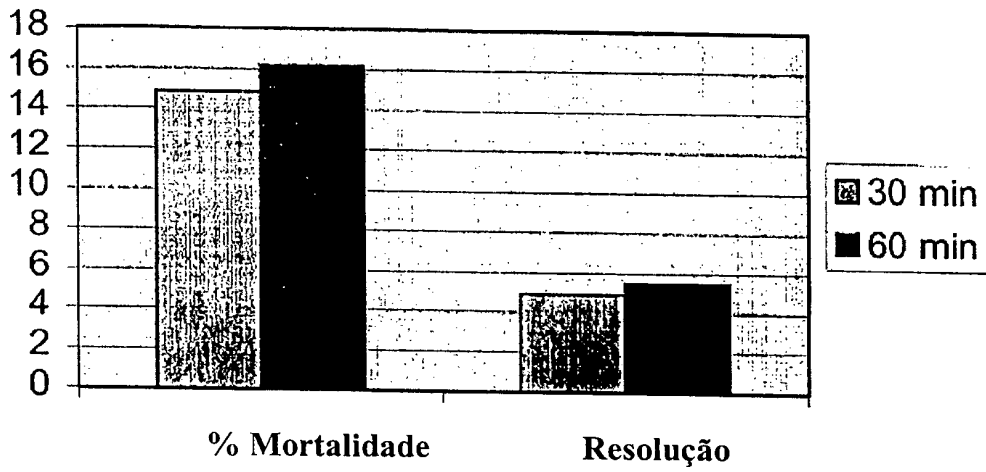


FIG. 4

101  
D

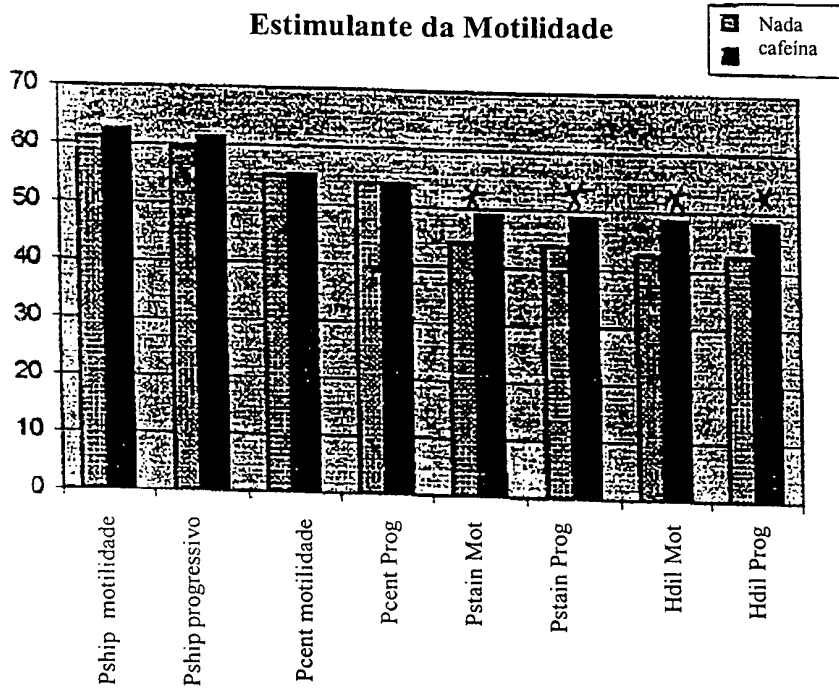


FIG 5

106  
07

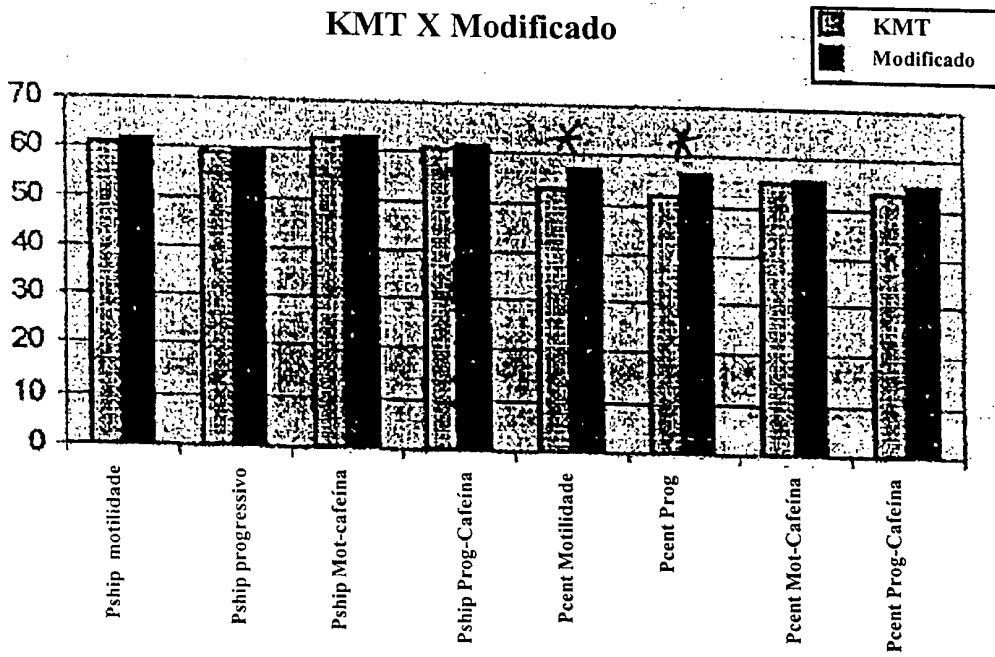


FIG. 6

10X  
2

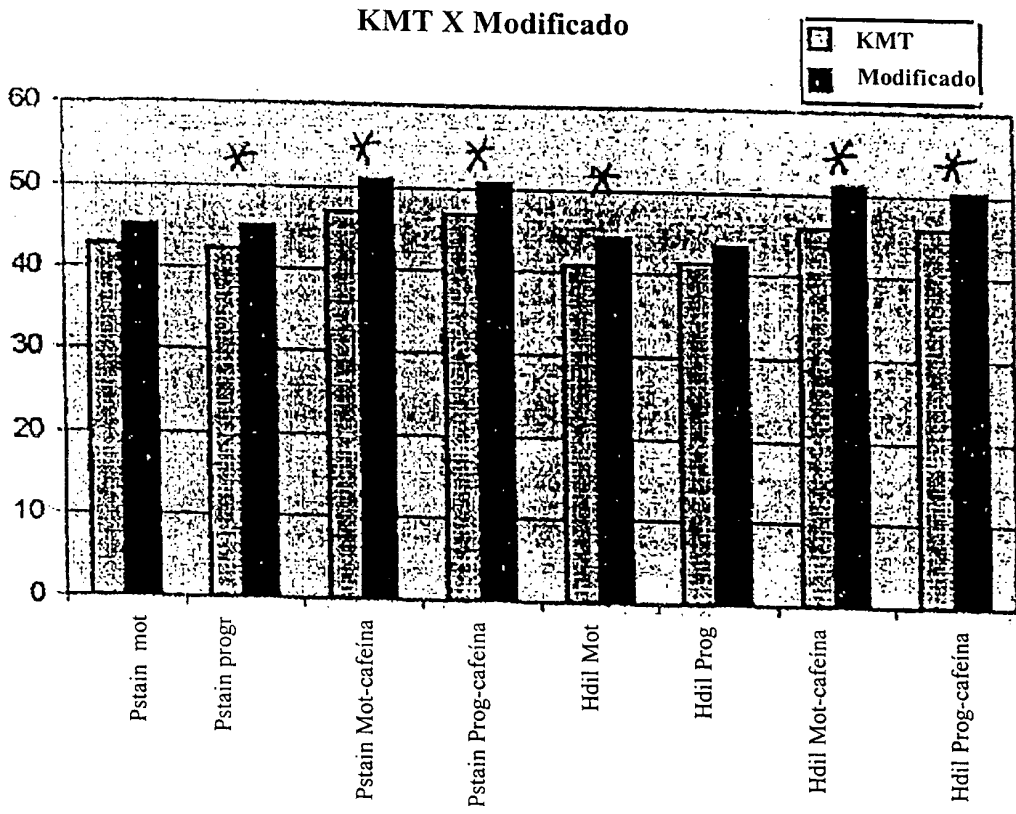
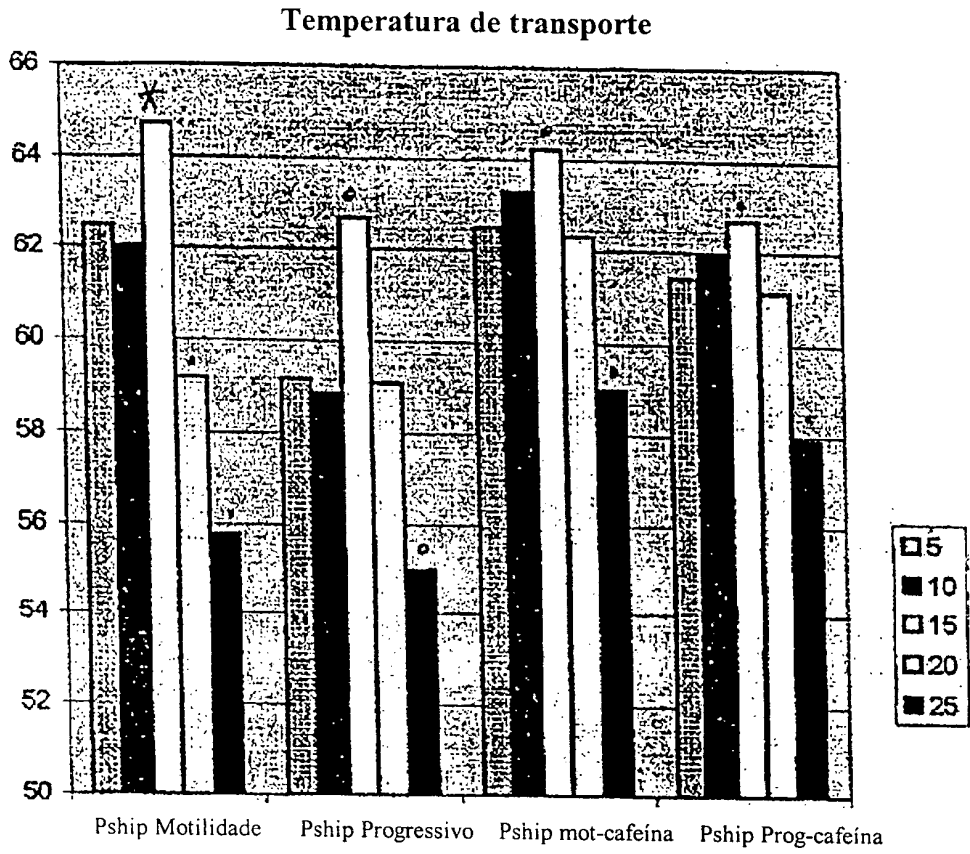


FIG. 7

109  
AD



**FIG. 8**

109/27

9/14

### Temperatura de transporte

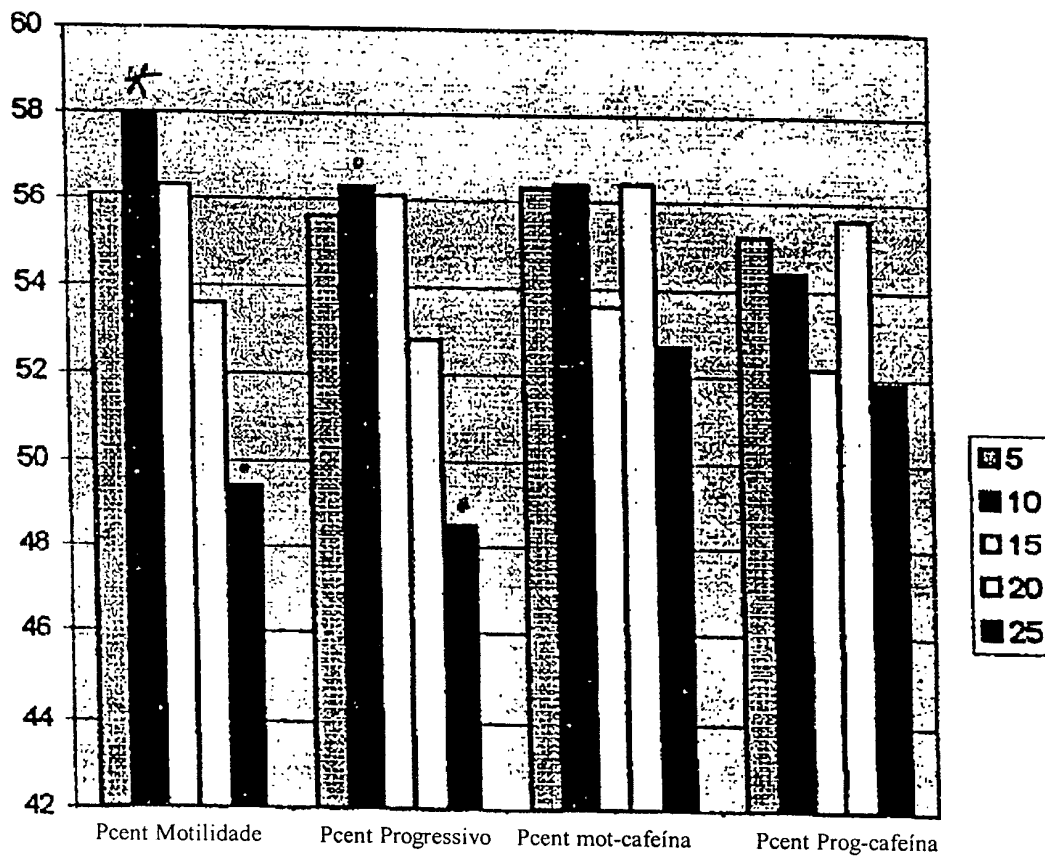


FIG. 9

110  
07

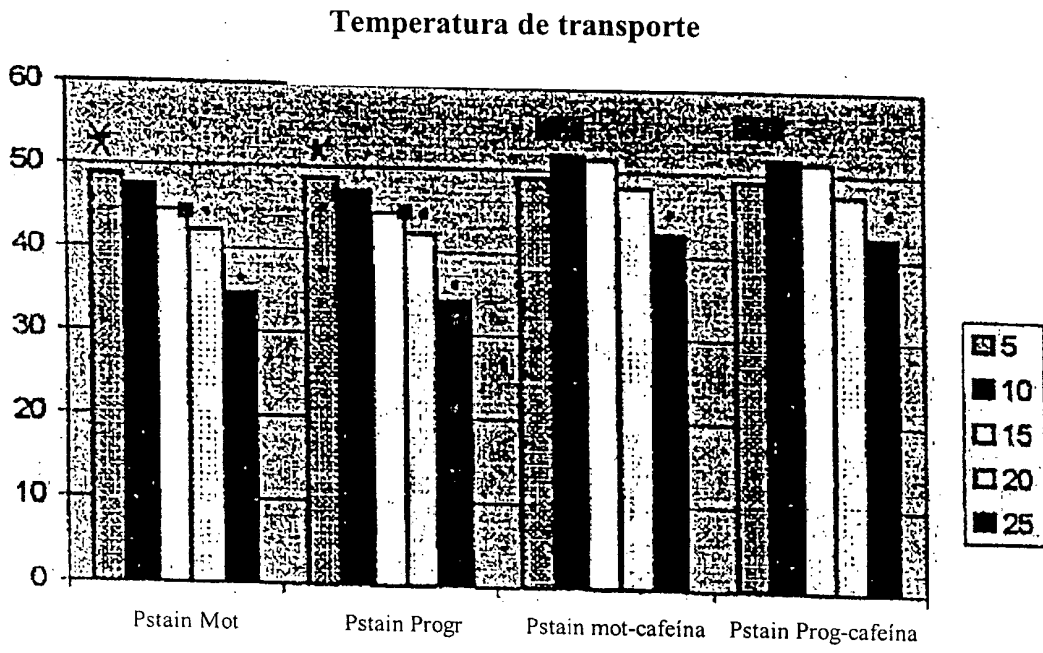


FIG. 10

Handwritten signature or initials in the top right corner.

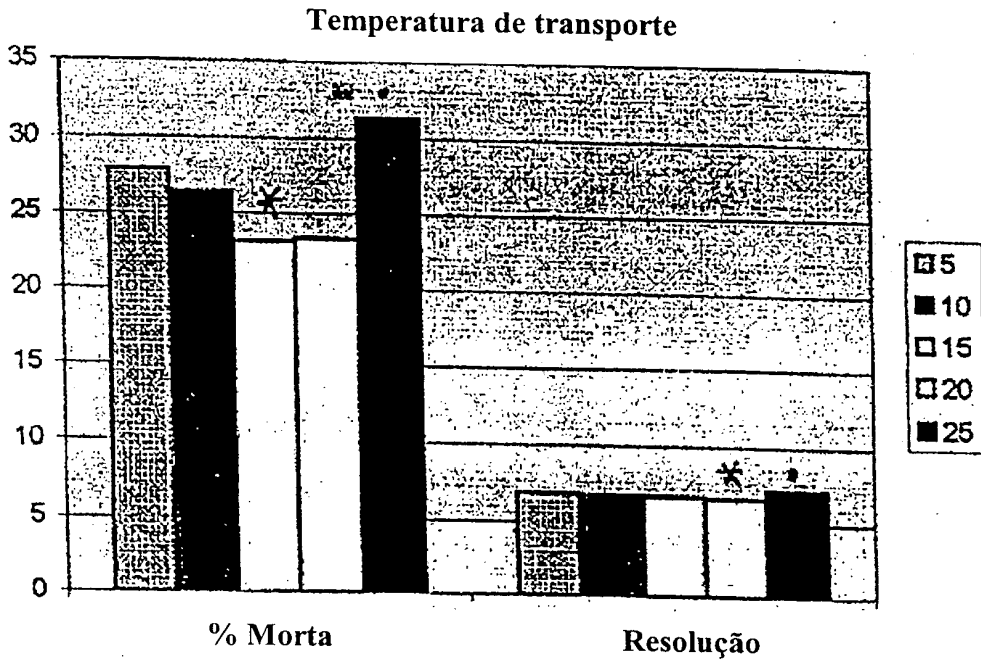


FIG. 11

MV  
D.

12/14

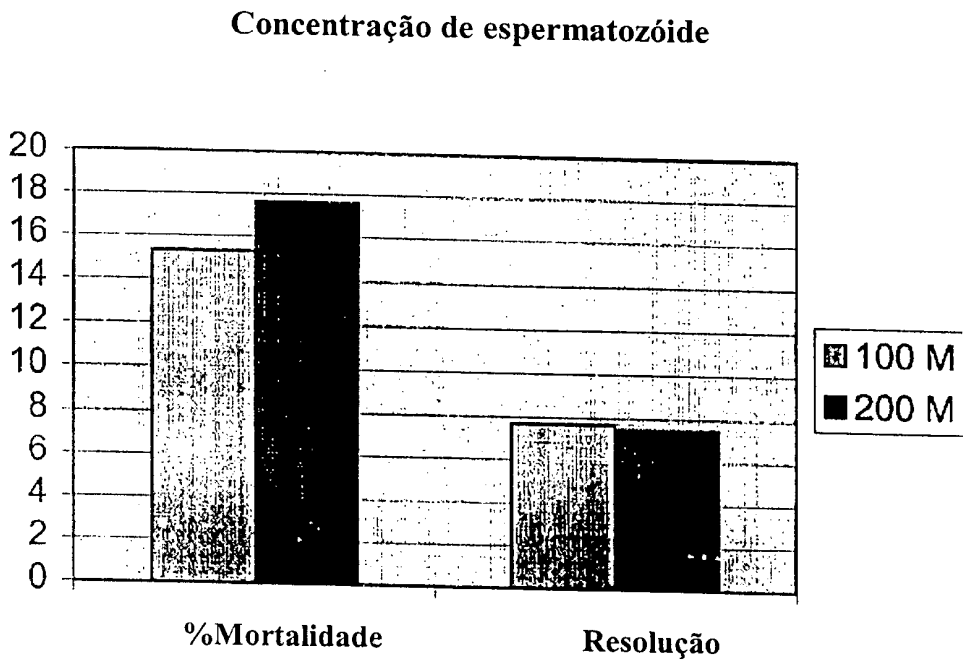


FIG. 12

11/2  
/

### Concentração de corante

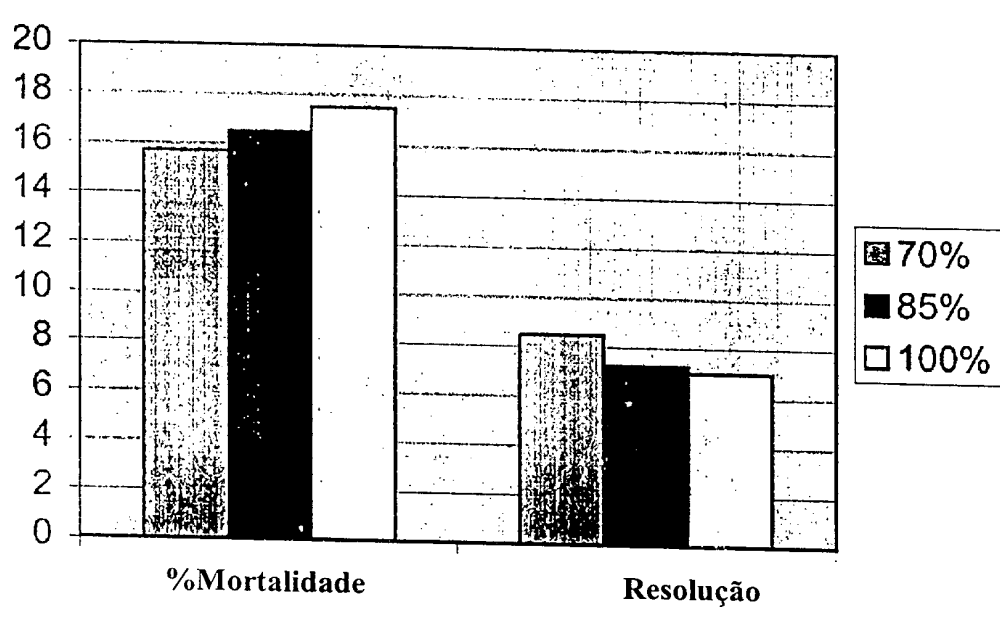


FIG. 13

MM  
D

Tempo de coloração

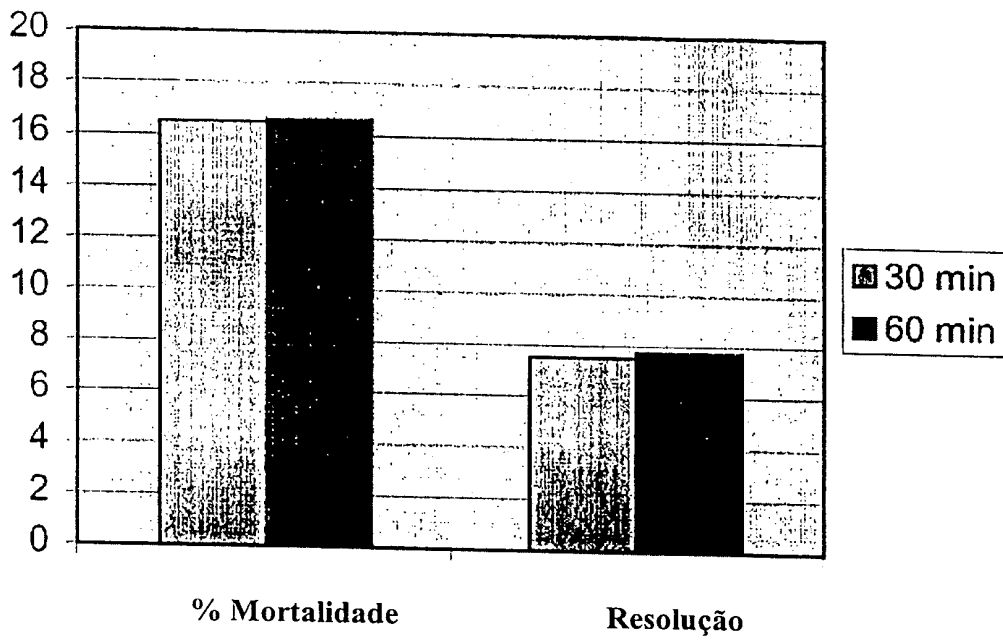


FIG. 14