

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3811
Telefax: (57-1) 211 8850
(57-1) 540 0880
Fax In U.S.A.: (1-306) 381 8880

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
SuperIntendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 03-054825-00005-0000
Rec: 2007-06-05 11:38:52 Dep. 2007 NUEVAS CREACIONES
REL 11 PATENTE/IN
Eva: 3/0 FASENACIONAL/IN
Act 444 NEB/INSTRUMENTAL/IN Tel: 50

Trámite : 002
Evento : 001
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 03.054.825
Asunto : Solicitud de patente para **DISPOSICIÓN PARA FERTILIZACIÓN IN-VITRO CON ESPERMATOZOIDES SEPARADOS DENTRO DE POBLACIONES QUE CONTIENEN CROMOSOMA X Y CROMOSOMA Y.**
Solicitante : COLORADO STATE UNIVERSITY AND XY, INC
Fecha de solicitud : 27 de junio de 2003.

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. **12403** notificado por fijación en lista del 27 de octubre de 2006.

2. Mediante el memorial radicado el 25 de enero de 2007, solicité oportunamente un plazo de 30 días para responder el Oficio No. **12403**.

3. Mediante el Oficio No. **12403** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente.

Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

3.1 CLARIDAD DE LA SOLICITUD

Para subsanar las objeciones que sobre claridad hizo su Despacho, presento nuevo pliego descriptivo y reivindicatorio con 19 reivindicaciones en el cual se han hecho los cambios respectivos, sugeridos por su Despacho. Para estos efectos, se han efectuado las siguientes modificaciones en el capítulo reivindicatorio:

- El nuevo pliego reivindicatorio se ha redactado eliminado el uso de términos relativos e imprecisos como "aproximadamente" y "alrededor". Adicionalmente, la nueva y única reivindicación independiente 1 describe con claridad la secuencia lógica de las etapas que caracterizan al *método para transportar oocitos* objeto de la presente solicitud de patente.

De la misma forma, las reivindicaciones dependientes 2 a 19 se han redactado para detallar las características generales de la invención, lo anterior dentro del alcance del objeto inicialmente reivindicado.

- En el nuevo pliego descriptivo se describen las figuras de forma clara, lo cual permite identificar el objeto que se pretende proteger así como a la vez permite que una persona versada en la materia reproduzca sin inconveniente la invención reivindicada. Así mismo se han incluido números de referencia en las figuras que facilitan la interpretación de las mismas.

Con las anteriores modificaciones del capítulo reivindicatorio quedan subsanadas las objeciones que por claridad hizo su Despacho ya que ahora cumplen con las disposiciones de los artículos 28 y 30 de la Decisión 486.

3. Por lo tanto, le solicito se sirva continuar con el trámite de la presente solicitud pues tanto la descripción como las reivindicaciones se presentan de una forma clara y en consecuencia, con fundamento en las mismas una persona versada en la materia podría realizar el examen de patentabilidad del producto objeto de esta invención. A pesar que las objeciones que sobre claridad planteó ese Despacho en el Oficio No. 12403 se deben tener por superadas, en el evento que el Despacho considere que sea necesario, respetuosamente le solicito hacer uso de la facultad que le otorga el artículo 45 inciso 2. de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina a efecto de requerir nuevamente de nuestra parte cualquier complementación o aclaración que considere necesaria.

4. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Anexos:

1. Nuevo pliego reivindicatorio con 19 reivindicaciones.
2. Nuevo pliego descriptivo.
3. Formulario de modificaciones.
4. Recibo por valor de \$99.000 por concepto de modificaciones en solicitud pendiente.

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

**FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES
2000-F03**

1

SOLICITUD DE:

☐

Corrección de Error Material

☒

Modificación a una solicitud

2

SOLICITANTE

**Nombre: COLORADO STATE UNIVERSITY
y XY, INC**

sociedades constituidas y existentes bajo las leyes
del Estado de Colorado, Estados Unidos de
América.

Dirección: Colorado State University,
Research Foundation,
Room 410, 801 South Howes Street,
Fort Collins, Colorado 80522,
Estados Unidos de América.

1108 North Lemay Avenue.
Fort Collins,
Colorado 80524
Estados Unidos de América

Domicilios: Fort Collins,
Colorado,
Estados Unidos de América

Teléfono: 548 09 70 **Fax:** 547 31 70
E-mail: clientes@camyp.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número: _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: Emilio FERRERO

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 38 11 **Fax:** 211 88 50

E-mail: cavelier@caveller.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número: 438.019 TP 31.929

4

Número de expediente: 03.054.825

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Se presentan nuevos capítulos descriptivo y reivindicatorio compuesto por 19 reivindicaciones con el
objeto de subsanar la posible falta de claridad de la solicitud.

6

Comprobante de pago No. 07-14.841 **Fecha:** 19 de febrero de 2007

7

Anexos

☒

Comprobante de pago de la tasa por \$ 99.000.00 por concepto de modificaciones.

☐

Poderes, si fuere el caso

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean
personas jurídicas.

8

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA:



C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.929

**DISPOSICION PARA FERTILIZACION IN-VITRO CON ESPERMATOZOIDES
SEPARADOS DENTRO DE POBLACIONES QUE CONTIENEN CROMOSOMA X Y
CROMOSOMA Y**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N° 60/253,787 presentada en noviembre 29, 2000 y la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos N° 60/253,785 presentada en noviembre 29, 2000, cada una de las cuales es incorporada a la presente a modo de referencia.

I. CAMPO TECNICO

Dispositivos, composiciones y métodos que mejoran la calidad de los embriones generados utilizando fertilización in-vitro (IVF) con espermatozoides separados en poblaciones que contienen cromosoma X y cromosoma Y.

II. ANTECEDENTE

Una característica atractiva del IVF es que muy pocos espermatozoides pueden ser requeridos para la inseminación a diferencia de la inseminación artificial. Sin embargo, el IVF utiliza espermatozoides separados dentro de poblaciones que contienen cromosoma X y cromosoma Y (espermatozoide separado) puede necesitar modificaciones con respecto a las técnicas convencionales IVF. Esto puede

deberse en parte a la pre-capacitación de tal espermatozoide.

En la mayoría de los casos, el porcentaje de oocitos (oocito , ootide, u óvulo, o una pluralidad de los mismos tal como es apropiado para la solicitud) fertilizados con espermatozoides separados y sin separar son similares, y los eventos durante el primer ciclo de célula son cronometrados similarmente para los espermatozoides separados y sin separar. Sin embargo con procedimientos convencionales, la producción del blastocisto con espermatozoide separado puede ser del 70%-90% de controles con espermatozoide que no han sido separado. Por ejemplo, el desarrollo de blastocisto ha mostrado ser del 17% con oositos bovinos inseminados con espermatozoides separados, comparado con >25% el cual puede esperarse con el IVF utilizando espermatozoide sin separar tal como se describe en el artículo jornal intitulado "Fertilización in-vitro con esperma bovino seleccionado por citometría de flujo" Teriogeneologia 52: 1393, 1405 (1999), incorporado a la presente a modo de referencia.

Varios factores pueden contribuir a estos resultados. Un factor puede ser aquel que pigmenta el esperma con Hoechst 33342 aparentemente causa una disminución en la movilidad del espermatozoide. Otro factor puede ser la fuerzas físicas a la que los espermatozoides

son sometidos durante el proceso de separación. Como un ejemplo, en la separación por citometría de flujo del espermatozoide, el mismo sale del citómetro de flujo a casi 100 km/h previo a impactar sobre la superficie del medio recolector. Durante el transito a través del citómetro de flujo el espermatozoide puede ser sometido a una luz láser de una intensidad sobre 100mW. Mientras que el tiempo de transito puede ser solo de 1-2 μ sec, esto puede afectar el ADN del espermatozoide, y de esta manera también afectar subsecuentemente el desarrollo embrionario. El proceso de separar espermatozoide con citometría de flujo puede dar como resultado una muestra altamente diluida, 600.000 espermatozoides/mL o menos, y los subsiguientes pasos de centrifugado son necesarios para proveer espermatozoides concentrados adecuados para la inseminación.

Otro problema con la utilización de espermatozoides en técnicas de IVF puede ser que la facilidad en la cual el espermatozoide es separado puede ser en una ubicación diferente que en donde el mamífero hembra de la cual son recolectados estén ubicados, los cuales pueden ser diferentes desde donde el mamífero hembra desde la cual los oositos son recolectados, estén ubicados, los cuales pueden estar en una ubicación diferente desde donde la fertilización in-vitro da a lugar, y la cual puede ser una ubicación diferente desde donde el mamífero hembra dentro

del cual los embriones cultivados in-vitro serán transferidos. Convencionalmente, el esperma separado puede ser crio-preservado y transportado congelado hacia la ubicación en donde la técnicas IVF son administradas. Los oositos en maduración son convencionalmente transportados hacia el establecimiento en el cual las técnicas de IVF son administradas, siendo estos sistemas de incubación portátiles. Los oositos en maduración son luego inseminados con células de esperma previamente congelado-descongelado. Para evitar la crio preservación de las células de esperma o como una conveniencia para las varias instalaciones incorporadas, puede ser beneficioso transportar los oositos en maduración directamente hacia el establecimiento de separación del espermatozoide, para que las células de esperma separadas puedan ser agregadas a los oositos sin la crio preservación. Sin embargo, el IVF convencional y la cultura in-vitro de la cigota resultante generalmente comprende un juego separado de aparatos y procedimientos que hacen inconveniente, difícil o imposible inseminar y cultivar oositos de la misma manera en que se separan los espermatozoides.

Incluso cuando los espermatozoides que contiene cromosoma X y cromosoma Y han sido diferenciados y separados basados sobre la diferencia de la fluorescencia emitida, durante varios años, e incluso cuando el

espermatozoide separado ha sido utilizado durante algún tiempo con las técnicas IVF, e incluso cuando existe un gran mercado comercial para embriones producidos con técnicas IVF y espermatozoides separados, los problemas mencionados anteriormente todavía no han sido resueltos.

Con respecto a los problemas con técnicas convencionales utilizando espermatozoides separados, y específicamente espermatozoide separado, espermatozoide pigmentado, o espermatozoide obtenido de esperma previamente congelado, y con las estrategias convencionales que incorporan el transporte de esperma separado y oositos en maduración, la invención se dirige a cada uno en una manera practica.

III. DIVULGACION DE LA INVENCION

De esta manera, uno de los amplios objetos de las realizaciones particulares de la invención, puede ser proveer dispositivos, composiciones y métodos que proveen el transporte de oositos inseminados, promueve la fisura de oositos fertilizados y mejora la calidad de los embriones generados con técnicas que utilizan espermatozoides separados en poblaciones que contienen cromosoma X y cromosoma Y

Otro amplio aspecto de las realizaciones particulares de la invención pede ser proveer dispositivos,

composiciones y métodos que promueven la fisura y mejoran la calidad de embriones generados utilizando IVF con espermatozoides que son derivados de esperma previamente congelados.

Otro objeto amplio de las realizaciones particulares de la invención puede ser proveer dispositivos composiciones y métodos que promueven la fisura y mejoran la calidad de los embriones generados utilizando IVF con espermatozoides que han sido previamente pigmentados con ADN unido con fluorocromo

Otro amplio aspecto de las relaciones particulares de la invención pueden ser proveer medios para el cultivo embrionario que puede contener aminoácidos no esenciales.

Otro amplio aspecto de la invención puede ser el proveer aparatos y métodos para transportar oocitos en maduración y oocitos fertilizados para la conveniencia del usuario final o para evitar la criopreservación del espermatozoide utilizado en ovositos fertilizados.

Los objetos naturalmente posteriores de la invención son divulgados a través de otras áreas de la memoria.

IV BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una recesión de la invención en donde los espermatozoides son pigmentados a partir de esperma fresco o previamente congelado y descongelado.

La figura 2 muestra una realización de la invención para separar espermatozoides pigmentados en poblaciones que contienen cromosomas x y cromosomas y.

La figura 3 muestra otra vista de una realización de la invención para separar espermatozoides pigmentados en poblaciones que contiene cromosomas x y cromosomas y.

La figura 4 muestra una realización de la disposición de incubación portátil en donde los ovositos pueden ser fertilizados.

V MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

La invención incluye dispositivos, métodos y composiciones para la inseminación en vitro y la fertilización de ovositos (ovosito, ootides, u óvulos o la pluralidad de los mismos tal como sea apropiado para la solicitud) y el cultivo de embriones resultando de tales técnicas.

Las realizaciones de la invención pueden incluir espermatozoides frescos, o espermatozoides a partir de esperma congelado y descongelado de varias especies de mamíferos. La invención puede ser interpretada no estando limitada por las especies de mamíferos citados por los

ejemplos específicos dentro de esta solicitud de patente. Las realizaciones de la invención, por ejemplo pueden incluir espermatozoide fresco o espermatozoide a partir de esperma congelado y descongelado de animales que presentan para los comerciales de carne o productos diarios o lácteos tales como porcinos, bovinos, equinos, búfalo o lo similar (naturalmente los mamíferos utilizados para carne o productos diarios o lácteos que pueden variar de cultura a cultura). Puede además incluir espermatozoide fresco o espermatozoide a partir de esperma congelado - descongelado a partir de individuales que presentan atributos raros o no comunes, tales como características morfológicas que incluyen peso tamaño o conformación u otras características deseadas tales como velocidad, agilidad, intelecto o lo similar. Pueden incluir esperma congelado - descongelado a partir de donantes muertos, o espermatozoide fresco o congelado - descongelado a partir de mamíferos raros o exóticos, tal como especímenes zoológicos o especies en peligro de extinción. Las realizaciones de la invención pueden además incluir espermatozoide fresco o congelado y descongelado recolectado de primates, incluyendo pero no estando limitado a, humanos chimpansés, gorilas y lo similar y puede además incluir espermatozoide fresco o congelado y descongelado a partir de mamíferos marinos tales como ballenas, marsopas y delfines.

Haciendo ahora referencia principalmente a la figura 1, en algunas realizaciones de la invención, la pigmentación a partir de Hoechst 33342 (2) puede ser agregado al espermatozoide bovino contenido en el esperma congelado - descongelado (1) para establecer una concentración de 224 μ M. El tiempo de incubación del espermatozoide contenido en el esperma congelado - descongelado (1) con la pigmentación (2) puede ser alrededor de 190 minutos. En otra realización de la invención, la pigmentación (2) puede ser agregada al esperma bovino (1) para establecer una concentración de 2240 μ M y luego incubado por un tiempo de 60 minutos. El esperma congelado - descongelado tratado de cualquier manera puede mejorar la resolución del espermatozoide que contiene en cromosoma x y el cromosoma y. Se puede entender, que de aplicación a aplicación (tal como esperma congelado - descongelado de diferentes especies) la cantidad de tiempo de incubación y la concentración específica del pigmento puede ajustarse para optimizar la resolución de espermatozoide que contiene cromosoma x y cromosoma y.

Con respecto a los promedios de fisura de los oocitos inseminados, el incremento en la concentración de pigmentación hasta al menos 10 x no aparenta tener un efecto depresivo en ya sea la fisura o el desarrollo

embriónico. A mayores concentraciones de pigmentación puede actualmente ser benéfico con respecto a ciertas aplicaciones debido a la longitud de ciertos del tiempo de incubación que puede ser reducido mejorando el porcentaje de fisura. De aplicación a aplicación la longitud del tiempo de incubación puede ser ajustado para optimizar los resultados de fisura o el desarrollo embriónico tal como se desee.

Haciendo ahora referencia principalmente a las figuras 2 y 3, una realización de citómetro de flujo de la invención es ilustrado el cual incluye una fuente de célula de esperma 13 el cual actúa para establecer o suministrar espermatozoides pigmentados u otro tipo de células pigmentadas para ser analizadas por el citómetro de flujo. Las células de esperma son depositadas dentro de una boquilla (4) de una manera tal que las células son rodeadas por una vaina de fluido (5). La vaina de fluido (5) está generalmente suministrada por alguna fuente de vaina de fluido (6) para que mientras la fuente de célula (3) suministra la célula de esperma, el fluido de vaina (5) está concurrentemente alimentado a través de la boquilla (4). En esta manera puede ser fácilmente entendido como la vaina de fluido (5) forma un medio ambiente de vaina de fluido para las células. Dado que varios fluidos son provistos al citómetro de flujo con algo de presión, estos

fluyen fuera de la boquilla (4) y salen del orificio de boquilla (7). Proveyendo algún tipo de oscilador (8) puede ser controlado muy precisamente a través de un control de oscilador (9), las ondas de presión pueden ser estabilizadas dentro de la boquilla (4) y transmitida a los fluidos que salen de la boquilla en el orificio de boquilla (7). Dado que el oscilador (9) de esta manera actúa sobre la vaina de fluido (5), la corriente (10) sale del orificio de boquilla (7) eventualmente y regularmente forma gotas (11). Debido a que las células de esperma son rodeadas por una vaina de medio ambiente de vaina de fluido, las gotas (11) pueden contenerse dentro de células aisladas individualmente (generalmente) u otros ítems.

Dado que las gotas (11) generalmente contienen de esperma aisladas, el citómetro de flujo puede distinguir y separar las gotas basadas sobre ya sea o no la célula de esperma apropiada que esté contenida dentro de la gota. Esto es realizado a través de una disposición de detección de célula (12). La disposición de detección de célula incorpora al menos algún tipo de sensor (13) el cual responde a las células contenidas de cada botón tal como se describe en la Patente Norteamericana US No. 5135759, incorporada a la presente a modo de referencia. Mientras que la patente de Johnson se basa sobre el espermatozoide o célula de esperma, aunque la pigmentación y las invenciones

de separación puede ser entendidas para ser utilizadas con una variedad de células congeladas - descongeladas, la disposición de detección de célula (12) puede causar una acción dependiendo sobre la presencia relativa o la ausencia relativa de fluorocromo incorporado el cual puede ser excitado por algún estimulante tal como un excitador láser (14). Mientras que cada tipo de célula de esperma puede pigmentado por un pigmento o fluorocromo, tal como fue descrito anteriormente, las diferentes longitudes del cromosoma x y el cromosoma y causan diferentes cantidades de pigmentos a ser unidos. De esta manera, detectando el grado de fluorescencia emitida por el fluorocromo luego de la excitación es posible discriminar entre los espermatozoides que contienen x y los espermatozoides que contienen y por sus diferentes niveles de emisión de fluorescencia.

Para realzar la separación y aislación de las células de esperma apropiadas, las señales recibidas por el sensor (13) son alimentadas a algún tipo de disposición de discriminación de selección (15) el cual rápidamente realiza una decisión de diferenciación y puede diferencialmente cargar cada gota (11) basada sobre ya sea si ha decidido que la célula de esperma deseada sale o no sale con aquella gota (11). De esta manera la separación o disposición de discriminación (15) actúa para permitir las

placas de deflexión electroestáticas (16) para que desvíen las gotas (11) basadas en ya sea o no que estas contengan la células de esperma apropiadas. Como resultado, el citómetro de flujo actúa para seleccionar las células de esperma causando que las mismas aterricen en una o más colectores (17) de esta manera detectando alguna propiedad de la célula de esperma del citómetro de flujo puede discriminar entre las células de esperma basadas en una característica particular y ubicar las mismas en un recolector apropiado (17). En la disposición presente utilizada para seleccionar espermatozoides, las gotas de espermatozoides que contienen cromosoma x son cargadas positivamente y de esta manera se desvían en una dirección, y las gotas de espermatozoide que contienen el cromosoma y son cargadas negativamente y de esta manera se desvían hacia el otro lado, y en donde la corriente de desperdicio (la que contiene células sin seleccionar) no es cargada y de esta manera es recolectada en una corriente sin desviar dentro de un tubo de succión o lo similar.

Haciendo ahora referencia principalmente a la figura 3, el proceso puede ser incluso entendido de mejor manera. Tal como se ilustra en aquella figura, la boquilla (4) emite una corriente (10) la cual debido al oscilador (8) no ilustrado en la figura 3) forma las gotas (11). Dado que la fuente de célula (3) (no ilustrada en la figura 3)

puede suministrar células de esperma (15) las cuales han sido pigmentadas de acuerdo con la invención, la magnitud de la emisión fluorescente estimulada por el excitador láser (14) es determinado diferencialmente por un sensor (13) para que la existencia o la no existencia de una carga en cada gota (11) sea separado de la corriente (10) que puede ser controlada por el citómetro de flujo. Este control da como resultado una carga positiva, una carga negativa y gotas sin cargar basado sobre la célula de esperma encapsulada. Tal como se dicta en la figura 3, ciertas gotas son ilustradas como gotas desviadas (18). Estas gotas desviadas (18) son aquellas que contienen células de esperma (15) diferenciadas por el contenido de cromosoma x o cromosoma y. Los espermatozoides separados son luego depositados en un recolector apropiado (17) para su uso posterior. Ver además la solicitud de Patente Internacional PCT/US98/27909, incorporada a la presente a modo de referencia.

Mientras que la descripción anterior se enfoca en la separación de espermatozoides con el citómetro de flujo, la separación de espermatozoides que contienen el cromosoma x y espermatozoides que contiene el cromosoma y basados sobre la diferencia en la medición de la ignición de fluorescencia puede además incluir varias otras tecnologías tales como la cromatografía líquida, electroforesis de gel,

y otras tecnologías que generalmente excitan la cantidad de flurocromo incorporado para diferenciar entre el espermatozoide que contiene el cromosoma x y el espermatozoide que contiene el cromosoma y.

Las retenciones de la invención también pueden comprender la recolección de oocitos a partir del mamífero hembra. Con respecto a ciertas realizaciones de la invención, los oocitos pueden ser aspirados desde los ovarios del mamífero hembra deseado o pueden ser obtenidos a partir del matadero de ovarios. Los oocitos pueden ser madurados en TCM 199 suplementados con alrededor de 10% de suero de ternero fetal de 10% más las hormonas (15 ng FSH, 1 µg LH, 1 µg E₂/ml) durante 22 a 24 horas a 39 °C, en alrededor de 5% de CO₂ en aire.

Diez de los 15 oocitos pueden ser transferidos a una gota de 50 µl de medio de fertilización que contiene aminoácidos no esenciales, tal como piruvato lactate albumin tiroides (TALP) suplementado con aminoácidos no esenciales derivados de águilas medianas, y en donde además puede contener 0.6% de suero bovino de albúmino, 29 µg de heparina/mL y 5 mM de cafeína. Alternativamente, los oocitos pueden ser fertilizados en otros medios que contienen aminoácidos no esenciales tales como el medio definido químicamente en el artículo jornal titulado "Tensión de oxígeno reducida y EDTA mejorado del desarrollo

de zygote bovino en un medio definido químicamente", J Anim Sci (1999), o el medio SOF descrito en el artículo jornal "cultura in vitro exitosa de óvulo de ganado y ovejas", J Reprod. Fertil. 30:493-497 (1972), cada artículo del jornal incorporado a la presente a modo de referencia.

Luego de separar o seleccionar, la célula de esperma puede ser lavada por centrifugado durante 10 minutos a 400 g en el medio de recolección (generalmente un medio de piruvato lactatio de albúmina hepes-tiroide suplementado con 2.0% suero bovino de albúmina) seguido por la suspensión en el medio de fertilización. El esperma seleccionado descongelado puede ser preparado por centrifugado durante 20 minutos a 700 g a través de un percoll graduado (90%: 45%) para la separación de esperma vivo y muerto. El pellet de esperma puede ser luego lavado con el medio de fertilización por el centrifugado a 400 g durante 10 minutos. El esperma puede ser luego agregado al medio de fertilización para dar una concentración de 1 a 2 millones/mL.

Tabla 1. Etapa de fisura del ovocito inseminado con esperma separado en cuatro medios de fertilización diferentes.

Medios	No.	5 segment.	2-célula	8 célula
--------	-----	------------	----------	----------

	oocitos		a 24 h	a 72 h
Fert-TALP	168	76	6 ^a	66
Fert-TALP + a.c.n.e.	176	71	26 ^b	67
CDM	167	89	75 ^c	70
SOF	145	86	49 ^d	69

a,b,c,d Medios con diferentes superíndice que difieren ($P < .05$).

Haciendo ahora referencia principalmente a la tabla 1, tal como puede entenderse, los oocitos inseminados con espermatozoide separado en un medio de fertilización que contiene aminoácidos no esenciales de acuerdo con la invención exhiben un promedio incrementado de un desarrollo temprano a través de al menos dos etapas de células.

Tabla 2. Desarrollo embrionario y calidad de blastocito resultante de la fertilización en cuatro medios de fertilización diferentes (promediado sobre dos medios de cultivo).

Medios	No. Oocitos	%blastocitos/oocitos		%grado 1 blastocitos/total ² de blastocitos
		Total	D7	
Fert- TALP	326	20	17	52 ^{a,c}
Fert- TALP -aa	221	20	17	68 ^b
CDM	332	22	18	61 ^{b,c}
SOF	321	21	17	64 ^{b,c}

^{a,b,c} Porcentajes sin superíndice diferentes comunes
(P<.05)

^d Grado 1 indica los blastocistos con una masa de célula interior distinta adecuada para la transferencia de embriones.

Haciendo referencia ahora principalmente a la tabla 2, alguna realizaciones de la invención en la cuales los oocitos son fertilizados con espermatozoides seleccionados en un medio de fertilización contienen aminoácidos no esenciales suplementados que exhiben una calidad mejorada de embriones. En las realizaciones de la invención en la cual oocitos fueron fertilizados en un piruvato lactatio alumini tiroides (TALP) suplementado con aminoácidos no esenciales derivados de águilas medianas, contienen además

0.6% de albúmina de suero bovino, 20 µg de heparina/mL y 5 mM de cafeína que fueron diferenciadas ($P < .05$) en la calidad de los embriones comparados con el TALP son los aminoácidos no esenciales.

Los supuestos cigotes pueden ser removidos del cultivo y ubicados en un medio definido químicamente (CDM-1) tal como se discute en el *jornal de ciencia animal*, 78, 152-157 (2000), incorporado a la presente a modo de referencia, durante 6 - 7 horas luego de la inseminación y cultivado durante 65 a 66 horas. Los embriones que son segmentados fueron además cultivado durante 96 horas en un CDM 2 (además contenía MEM esencial y aminoácidos no esenciales y 2.0 mM de fructuosa) que contiene 0.12 IU de insulina/mL. Los blastocistos fueron graduados morfológicamente de acuerdo con el tamaño de la masa de célula interna y pigmentados con Giemsa para determinar el número de células en el séptimo día luego de la inseminación.

Haciendo ahora referencia a la figura 4, la invención además incorpora una disposición de incubación portátil. Ciertas realizaciones de la invención pueden comprender una cánula (19) que presenta un volumen interior entre alrededor de 0.1 mL y alrededor de 0.5 mL dentro del cual el medio de fertilización, y los oocitos recolectados del miembro hembra, pueden ser transferidos. Mientras que

la cánula 19 puede ser hecha de cualquier material compatible con el medio de fertilización y los oocitos recolectados, la realización específicas de la cánula (19) pueden ser hechas de plástico, tal como o similar a una cánula de inseminación artificial. Los extremos de la cánula de plástico pueden ser sellados por calor luego del medio de fertilización y los oocitos son transferidos ahí dentro.

La invención además puede comprender un elemento de incubación (20) configurado para encapsular la cánula (19) o una pluralidad de cánulas insertadas dentro de la misma. En algunas realizaciones de la invención el elemento de incubación (20) puede ser un tubo de vidrio que presenta un elemento de aberturas sellable únicamente, el elemento de abertura (21) puede ser sellado con una tapa (22), y en algunas realizaciones la tapa (22) y el tubo pueden tener roscas espirales (23) que pueden ser roscados por giro para cerrar el elemento de incubación (20).

Luego de transferir una cánula (19) o una pluralidad de cánulas al volumen interior del elemento de incubación (20) las condiciones de incubación pueden ser establecidas dentro de las mismas. Las condiciones de incubación típicas dentro del volumen interior del elemento de incubación puede comprender una atmósfera de 5% de dióxido de carbono en aire y una temperatura de alrededor

de 39 °C (37 °C a 41°C). Una vez que las condiciones de incubación son establecidas dentro del elemento de incubación, el elemento de incubación (20) puede ser sellado y los oocitos pueden ser luego transportados dentro del elementos de incubación (20).

En algunas realizaciones de la invención, los oocitos pueden ser transportados a una instalación de separación de célula de esperma en donde el elemento de incubación (20) es abierto, la cánula (19) es abierta y una pluralidad de célula de esperma (15) a partir de una población separada en base de el contenido de cromosoma x y contenido de cromosoma y puede ser transferido dentro de la cánula (19) conteniendo los oocitos. Con respecto a algunas realizaciones de la invención una concentración de células de esperma separadas (15) pueden ser establecidas dentro de alrededor de un millón a alrededor de dos millones/mL de medios de fertilización. La cánula (19) que contiene los oocitos y el espermatozoide en el medio de fertilización pueden ser luego resellados y transferidos nuevamente al elemento de incubación (20). Las condiciones de incubación pueden ser reestablecidas y el elemento de incubación sellado nuevamente. El elemento de incubación (20) que contiene una cánula o una pluralidad de cánulas (19) pueden luego ser transportado. Durante el transporte los oocitos pueden ser fertilizados. Luego del arribo los cigotes

pueden ser transferidos desde la cánula para un cultivo posterior. Con respecto a ciertas realizaciones de la invención, los oocitos pueden ser primeramente inseminados con espermatozoides separados o sin separar en cuotas convencionales de 50 mL y cargados en una cánula o cánulas de 0.25 mL (19) dentro de dos horas luego de la inseminación. Las cánulas (19) pueden ser selladas por calor y puestas en el elemento de incubación (20). El elemento de incubación abierto contiene cánulas con oocitos inseminados que pueden ser equilibrados con 5% de dióxido de carbono en aire y alrededor de 39 °C durante al menos una hora y luego tapados a presión y cultivados bajo las mismas condiciones durante alrededor de 18 a 20 horas.

Haciendo referencia nuevamente a la tabla 2, muy pocos oocitos ($P < 0.05$) fertilizados en el Fert-TALP desarrollaron a la etapa de dos células durante 24 horas que en cualquier otro medio. Notablemente, la vasta mayoría de oocitos (75%) fertilizados en un medio CDM segmentados a la etapa de dos células por este tiempo. Luego de 72 horas de la post inseminación, no existió diferencia entre cualquiera de los medios, posiblemente debido a la tapa larga de 8 células del ciclo de células.

No existe diferencia entre cualquiera de los medios en el promedio de desarrollo al blastocistos. Sin embargo, existió una diferencia significativa en la calidad de los

embriones entre el Fert-TALP y el Fert-TALP + los aminoácidos no esenciales.

La progresión del desarrollo embrionario temprano del bovino utilizando espermatozoides separados son similares a los estudios con la fisura in vivo o in vitro de oocitos fertilizados con espermatozoides sin separar. En la vaca, la primer fisura in vivo sucede a las 24-28 horas siguientes de la ovulación, y la primer fisura in vitro toma lugar a las 24-48 horas luego de la inseminación.

La fisura temprana sucedió con los oocitos fertilizados en un medio CDM, SOF y Fert-TALP + aa que en el medio convencional Fert-TALP. Esto puede ser debido a que el CDM, SOF, y el Fert-TALP + los aminoácidos no esenciales contenían todos aminoácidos no esenciales los cuales pueden jugar un rol en como el espermatozoide penetra rápidamente el oocito, en la longitud del primer ciclo de célula.

Tal como puede ser fácilmente entendido a partir de lo mencionado anteriormente, el concepto básico de la presente invención puede ser realizado en la variedad de modo. Incorpora la pigmentación de espermatozoide en donde el espermatozoide fresco o espermatozoide congelado - descongelado, la separación y técnicas de aleación las cuales pueden ser utilizadas con tales espermatozoides pigmentados, así como también dispositivos para realizar la

pigmentación, separación, aislación de tales espermatozoides pigmentados dentro de poblaciones que contienen cromosoma x y cromosoma y, y el transporte de oocitos en maduración y oocitos fertilizados. En esta solicitud de patente, el pigmentado y las técnicas de separación utilizados con espermatozoides son divulgados como parte del resultado ilustrado para ser alcanzado por varios dispositivos descritos y mientras que los pasos son inherentes a la utilización. Estos son simplemente los resultados naturales de la utilización del dispositivo tal como son intencionados y descritos. Además, mientras que algunos dispositivos son divulgados debe entenderse que estos no sólo realizan ciertos métodos que además pueden ser variados en un número de modos. Es importante con respecto a todo lo antedicho, que todas estas facetas deben ser entendidas para ser abarcada por esta divulgación.

La discusión incluida en esta solicitud de patente del Tratado de Cooperación de Patente internacional es su intención servir como descripción básica. El lector debe ser consciente de que la discusión específica no puede ser explícitamente descrita con todas las realizaciones posibles; varias alternativas son implícitas. También puede no aplicar completamente la naturaleza genérica de la invención y puede no mostrar explícitamente como cada característica o elemento puede actualmente ser

representativo de una función más amplia o de una mayor variedad de alternativas o elementos equivalentes. Nuevamente, estos son implícitamente incluidos en esta divulgación. En donde la invención es descrita en base a la terminología orientada funcionalmente, cada aspecto de la función es realizado por un dispositivo su retina o programa. Las reivindicaciones del aparato pueden no sólo ser incluidas para el dispositivo descrito, pero además las reivindicaciones de métodos o procesos pueden ser incluidos para dirigir las funciones de la invención y cada elemento que lo realiza. Ninguna de las descripciones ni la terminología está dirigida a limitar el alcance de las reivindicaciones las cuales ahora son incluidas.

Además, cada uno de los varios elementos de la invención y reivindicaciones pueden además ser alcanzados de una variedad de maneras. Esta divulgación debe ser entendida para abarcar tal cada variación, puede ser una variación de una realización o cualquier realización de aparato, un método o realización de proceso, o incluso meramente una variación de cualquiera de los elementos de estos. Particularmente, debe entenderse que mientras la divulgación se refiere a elementos de la invención, las palabras para cada elemento puede ser expresado por términos de aparatos equivalentes o términos de métodos, incluso si sobre la función el resultado es el mismo. Tales

términos equivalentes más amplios o incluso más genéricos deben ser considerados para que abarquen en la descripción de cada elemento u opción. Tales términos pueden ser sustituidos cuando se lo desea para hacer explícito la cobertura de amplitud implícita a la cual esta invención está dirigida. Como un ejemplo debe entenderse que todas las acciones pueden ser expresadas como medio para tomar aquella acción o como un elemento el cual realiza esa acción. Similarmente, cada elemento físico divulgado debe ser entendido para que abarque una divulgación de la acción la cual ese elemento físico facilita. Respecto de este último aspecto y sólo como un ejemplo, la divulgación de un seleccionador debe ser entendido para que abarque la divulgación del acto de seleccionar, en donde explícitamente esté discutido o no, y a su vez en donde sólo la divulgación del acto de seleccionar tal como una divulgación debe ser entendida para abarcar la divulgación de un seleccionador o incluso un medio para seleccionar. Tales cambios y términos alternativos deben ser entendidos para que sean incluidos explícitamente en la descripción.

Adicionalmente, varias combinaciones y permutaciones de todos los elementos o aplicaciones pueden ser creadas y presentadas. Todas pueden ser realizadas para optimizar el diseño o rendimiento en una solicitud específica.

Cualquier acto de ley estatuto regulación o reglas mencionadas en esta solicitud para la patente: o patentes publicaciones u otras referencias mencionadas en esta solicitud para patente son incorporadas a la presente a modo de referencia. Específicamente, la Solicitud de Patente Provisional US No. 60/253787, presentada en Noviembre 29, y 2000 y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos US No. 60/253785 presentada el 29 de Noviembre de 2000 son incorporadas a la presente a modo de referencia incluyendo cualquier figura o adjunto, cada una de las referencias en la siguiente tabla de referencias son incorporadas a la presente a modo de referencia.

La bibliografía que se menciona en la presente será respetada en su idioma original para facilitar la identificación de la misma.

Documentos de Patente de EE.UU.

DOCUMENTO N°	FECHA	NOMBRE	CLASE	SUBCLAS E	FECHA PRESEN.
32,350	02/10/87	Bhattacharya			11/22/74
3,687,806	08/29/72	Van den Bovenkamp	195	1.3	11/04/69
3,829,216	08/13/74	Persidsky	356	36	10/02/72
3,894,529	07/15/75	Shrimpton	128	1 R	04/10/69
4,009,260	02/22/77	Ericsson	424	105	12/11/74
4,067,965	01/10/78	Bhattacharya	424	105	12/17/75
4,083,957	04/11/78	Lang	424	78	02/04/76

4,085,205	04/18/78	Hancock	424	105	01/24/77
4,092,229	05/30/78	Bhattacharya a	204	180 R	10/20/76
4,155,831	05/22/79	Bhattacharya a	207	299 R	02/23/78
4,191,749	03/04/80	Bryant	424	105	10/11/77
4,225,405	09/30/80	Lawson	204	180 R	08/16/78
4,276,139	06/30/81	Lawson	204	180 R	10/09/79
4,339,434	07/13/82	Ericsson	424	105	08/17/81
4,362,246	12/07/82	Adair	209	3.3	07/14/80
4,448,767	05/15/84	Bryant	424	85	02/15/80
4,474,875	10/02/84	Shrimpton	435	002	08/18/80
4,501,366	02/26/85	Thompson	209	556	12/14/82
4,511,661	04/16/85	Goldberg	436	503	12/30/83
4,605,558	08/12/86	Shrimpton	424	561	04/20/84
4,660,971	04/28/87	Sage et al.	356	39	05/03/84
4,680,258	07/14/87	Hammerling et al	435	7	08/09/83
4,673,288	06/16/87	Thomas et al.			
4,683,195	07/28/97	Mullis et al			
4,683,202	07/28/87	Mullis			
4,698,142	10/06/87	Muroi et al	204	182.3	07/31/85
4,749,458	06/07/88	Muroi et al	204	182.3	03/02/87
4,790,653	12/13/88	North, Jr.			
4,988,619	01/29/91	Pinkel	435	30	11/30/87
4,999,283	03/12/91	Zavos et al	435	2	08/18/89
5,021,244	06/04/91	Spaulding	424	561	05/12/89

5,055,393	10/08/91	Kwoh et al			
5,135,759	08/04/92	Johnson	424	561	04/26/91
5,346,990	09/13/94	Spaulding	530	350	03/12/91
5,371,585	12/06/94	Morgan et al.	356	246	11/10/92
5,437,987	08/01/95	Ten et al			
5,439,362	08/08/95	Spaulding	424	185.1	07/25/94
5,461,145	10/24/95	Kudo et al			
5,466,572	11/14/95	Sasaki et al.	435	2	04/25/94
5,480,774					
5,483,469	01/09/96	Van den Engh et al.	364	555	08/02/93
5,494,795	2/27/96	Guerry et al.	435	6	5/5/93
5,503,994	04/02/96	Shear et al.	436	90	10/08/93
5,578,449	11/26/96	Frasch et al.	435	6	4/20/95
5,514,537	05/07/96	Chandler	435	002	11/28/94
5,589,457	12/31/96	Wiltbank	514	12	07-03-95
5,602,039	02/11/97	Van den Engh	436	164	10/14/94
5,602,349	02/11/97	Van den Engh	73	864.85	10/14/94
5,622,820	4/11/97	Rossi	435	5	11/3/94
5,641,457	03/09/99	Tomiyama et al.	250	207	06/16/97
5,643,796	07/01/97	Van den Engh et al	436	50	10/14/4
5,660,997	08/26/97	Spaulding	435	7.21	06/07/95
5,690,895	11/25/97	Matsumoto et al.	422	73	12/06/96
5,700,692	12/23/97	Sweet	436	50	09/27/94
5,726,364	03/10/98	Van den Engh	73	864.85	02/10/97
5,819,948	10/13/98	Van den Engh	209	158	08/21/97

5,876,942	3/2/99	Cheng et al	435	6	7/24/97
5,880,457	03/09/99	Tomiyama et al.	250	207	06/16/97
5,985,216	11/16/99	Rens, et al.	422	073	07/24/97
6,071,689	06/06/00	Seidel et al.	435	2	01/29/98

Documentos Extranjeros

DOCUMENTO N°	FECHA	PAIS
WO 96/12171	10/13/95	United States
WO 98/34094	06/08/98	NZ
WO 99/05504	07/24/98	US
WO 99/33956	08/07/99	US
WO 99/38883	05/08/99	US
WO 99/42810	08/26/99	US
WO 00/06193	10/02/00	US

Otros Documentos de Referencia

Roser, JF., Evans, J.W., Kiefer, DP., Neeley, D.P. and Pacheco, C.A. 1980. Reproductive efficiency in mares with anti-hCG antibodies. Proc 9 th Int. Congr. Artira. Repro. and A.I. 4:627. abstr.
"Applying Semen Sexing Technology to the AI Industry", National Association of Animal Breeders, September 2000, pp. 1-16
"Sexed Semen Offers Faster Genetic Gain", Farming News, Livestock Supplement, February 1997, p. 28.
Akhtar, S., et al., "Prevalence of Five Stereotypes of Bluetongue Virus in a Rambouillet Sheep Flock in Pakistan", Veterinary record 136, 1995, p. 495.
Akhtar, S., et al., "Sex Preselected in Cattle: a Field Trial", Veterinary Record 136, 1995, p. 495-496.
Aldrich, S. L., Berger, L.L., Reiling, B.A., Kegler, D.I., and Nagh, T.G.. 1995. "Parturition and periparturient reproductive and metabolic hormone concentration in prenatally androgenized beefheifer", I. Anim. Sci. 73:3712.
Amann, R. P. "Issues affecting commercialization of sexed sperm". Therio: 52:1441, 1999
Amann, R.P. et al, "Prospects For Sexing Mammalian Sperm," Colorado Associated University Press, Animal Reproduction Laboratory College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, CO, 80523, 1982

American Meat Science Association in cooperation with National Livestock and Meat Board. "Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness measurements of fresh meat", 1995
Amoah, E.A. and Gelaye, S. 1996. Biotechnological advances in goat reproduction. J. Anim. Sci. 75(2):578-585.
Andersen, V.K., Aamdal, J. and Fougner, J.A. 1973. Intrauterine und tiefzervikale Insemination mit Gefriersperma beim Schaf. Zuchthygiene. 8:113-118.
Bagley, C. P. 1993. Nutritional management of replacement beef heifers -A review. J. Anim. Sci. 71:3155-3163.
Bailey, C. M., Reid, C.R., Ringkob, T.P., Koh, Y.O., and Foote, W.D. "Nulliparous versus primiparous crossbred females for beef." J. Anim. Sci. 69:1403., 1991
Baker, R.D., Dziuk, P.J. and Norton, H.W. 1968. Effect of volume of semen, number of sperm and drugs on transport of sperm in artificially inseminated gilts. J. Anim. Sci. 27:88-93.
Barnes, F.L. and Eyestone, W.H., "Early Cleavage and the Maternal Zygotic Transition in Bovine Embryos", Theriogenology, Vol. 33, No. 1, January 1990, pp. 141-149
Becker, S.E. and Johnson, A.L. 1992. Effects of gonadotropin releasing hormone infused in a pulsatile or continuous fashion on serum gonadotropin concentrations and ovulation in the mare. J. Anim. Sci. 70:1208-1215.
Bedford, S. J. and Hinrichs, K. 1994. The effect of insemination volume on pregnancy rates of pony mares. Theriogenology 42:571-578.
Bellows, R. A., Short, R.E., Anderson, D.C., Knapp, B.W., and Pahnish, O.F. "Cause and effect relationships associated with calving difficulty and calfbirth weight", J. Anim. Sci. 33:407, 1971
Berardinelli, J. G., R. A. Dailey, R. L. Butcher, and E. K. Inskeep. "Source of progesterone prior to puberty in beef heifers". J. Anim. Sci. 49:1276., 1979
Berger, G.S. 1987. Intratubal insemination. Fert. Steril. 48:328-330.
Bergfeld, E. G., Kojima, F.N., Cupp, A.S., Wehmann, M.E., Peters, K.T., Garciawinder, M., and Kinder, J.E., "Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy-intake", Bio. of Repro. 51:1051, 1994
Berry, B. W., Smith, G.C., and Carpenter, J., "Beef carcass maturity indicators and palatability attributes", J. Anim. Sci. 38:507, 1974
Beyhan, Z., et al., "Sexual Dimorphism in IVF Bovine Embryos Produced by Sperm Sorted by High Speed Flow Cytometry", Theriogenology 49, 1998, p. 359.

Blanchard, T. and Dickson, V., "Stallion Management", The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice, Vol. 8, No. 1, April 1992, pp 207 - 218.
Bond, J., et al., "Growth and carcass traits of open beef heifers versus beef heifers that have calved", Nutrition Reports International 34:621. 1986
Boucque, C. V., et al., "Beef-production with maiden and once-calved heifers", Livestock Prod. Sci. 7:121. 1980
Bourdon, R. M. and J. S. Brinks. "Simulated efficiency of range beef -production". Culling strategies and nontraditional management-systems. J. Anim. Sci. 65:963. 1987
Bracher, V. and Allen, W.R., "Videoendoscopic Examination of the Mare's Uterus: Findings in Normal Fertile Mares", Equine Veterinary Journal, Vol. 24 (1992), pp. 274-278
Braselton, W.E. and McShan, W.H. 1970. "Purification and properties of follicle stimulating and luteinizing hormones from horse pituitary glands", Arch. Biochem. Biophys. 139:45-48.
Brethour, J. R., "The single-calfheifer system", Kans. Agric. Sta. Rep. Frog. 570. 1989
Bristol, S.P. 1982. Breeding behavior of a stallion at pasture with 20 mares in synchronized oestrus. J. Reprod. Fert. Suppl. 32:71.
Brookes, A. J. and Obyrne, M., "Use of cow-heifers in beef production", J. of the Royal Agricultural Society of England 126:30. 1965
Buchanan, B.R., et al, "Insemination of Mares with Low Numbers of Either Unsexed or Sexed Spermatozoa", Theriogenology, Vol. 53, pp 1333-1344, (2000)
Burns, P. D. and Spitzer, J.C., "Influence of biostimulation on reproduction in postpartum beef-cows", J. Anim. Sci. 70:358. 1992
Burwash, L.D., Pickett, B.W., Voss, J.L. and Back, D.G. 1974. "Relationship of duration of estms to pregnancy rate in normally cycling, non-lactating mares" J.A.V.M.A. 165:714-716.
Byerley, D. J., et al., "Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or 3rd estrus". J Anim. Sci. 65:645. 1987
Caslick, E.A., "The Vulva and the Vulvo-vaginal Orifice and its Relation to Genital Health of the Thoroughbred Mare", Cornell Veterinarian, Vol. 27, 1937, pp. 178-187
Catt, et al., "Assessment of Ram and Boar Spermatozoa During Cell-Sorting by Flow Cytometry", Reproduction Dom Animal, Vol. 32, 1997, pp 251-258.
Catt, S.L., et al., "Birth of a Male Lamb Derived from an In Vitro Matured Oocyte Fertilized by Intracytoplasmic Injection of a Single Presumptive Male Sperm", Veterinary

Record 139, 1996, pp. 494-495.
Chin, W.W. and Boime, I. 1990. In: Glycoprotein Hormones. Serona Symp. Norwell, MA. pp. 19-20
Chung, Y.G., Schenk, J.L., Herickhoff, L.A. and Seidel, G.E. Jr. 1998. Artificial insemination of superovulated heifers with 600,000 sexed sperm. J Anim. Sci. Suppl. 1. 836:215. abstr.
Clement, F., Vincent, P., Mahla, R., Meriaux, J.C. and Palmer, E. 1998. Which insemination fertilizes when several successive inseminations are performed before ovulation. 7th Int. Symp. Eq. Repro. 151. abstr.
Coleou, J., et al., "Essai de velage tres precoce de genisses en vue de la production de viande." Essai Vauz/Aure no.50, programme USFGC-INAPG-ITFC. 1974
Cran, D.G., et al., "Production of Bovine Calves Following Separation of X- and Y- Chromosome Bearing Sperm and In Vitro Fertilisation", Veterinary Record 132, 1993, pp. 40-41.
Cran, D.G., et al., "Production of Lambs by Low Dose Intrauterine Insemination with Flow Cytometrically Sorted and Unsorted Semen", Theriogenology 47, 1997, p. 267.
Crowley, J. P. The facts of once-bred heifer production. (Ed) J.B. Owens. The maiden female-a means of increasing meat production. School of Agric., Univ. of Aberdeen, Scotland. 1973
Curran, S. 1998. In: Equine Diagnostic Ultrasonography. Fetal gender determination. Rantanen & McKinnon. 1st Ed. Williams and Wilkins. pp. 165-169.
Day, B.N., Abeydeera, L.R., Johnson, L.A., Welch, G.R., Wang, W.H., Cantley, T.C. and Rieke, A. 1998. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. Theriogenology. 49(1):360. abstr.
Dean, P.N., Pinkel, D. and Mendelsob. n, M.L. 1978. Hydrodynamic orientation of spermatozoa heads for flow cytometry. Biophys. J. 23:7-13.
Demick, D.S., Voss, J.L. and Pickett, B.W. 1976. Effect of cooling, storage, glycerization and spermatozoal numbers on equine fertility. J. Anim. Sci. 43:633-637.
DenDaas, J.H.G., De Jong, G., Lansbergen, L.M.T.E. and Van Wagtendonk-De Leeuw, A.M. 1998. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of dairy bulls. J Dairy Sci. 81: 1714-1723.
Denham, A. "In-vitro studies on sandhill range forage as related to cattle preference", M.S. Thesis. 1965. Colorado State University.
Deutscher, G. H. "Extending interval from seventeen to nineteen days in the melengestrol acetate-prostaglandin

estrous synchronization program for heifers". The Professional Animal Scientist 16:164. 2000
"Diagnostic Products Corporation. Coat-A-Count" , Progesterone.com. 1998.
Dikeman, M. E. "Cattle production systems to meet future consumer demands. J. Anim. Sci. 59:1631, 1984
Dinnyes, A., et al., "Timing of the First Cleavage Post-insemination Affects Cryosurvival of In Vitro-produced Bovine Blastocysts", Molec Reprod Develop 53, 1999, pp 318-324.
Donaldson, L. E., "Effect of Insemination Regimen on Embryo Production in Superovulated Cows", The Veterinary Record, July 13, 1985, pp. 35-37
Donoghue, A.M., Byers, A.P., Johnston, L.A., Armstrong, D.L. and Wildt, D.E. 1996. Timing of ovulation after gonadotropin induction and its importance to successful intrauterine insemination in the tiger (Panthera tigris). J. Reprod. Fert. 107:53-58.
Douglas, R.H. 1979. Review of superovulation and embryo transfer in the equine. Theriogenology. 11:33-46.
Douglas, R.H., Nutt, L. and Ginther, O.J. 1974. Induction of ovulation and multiple ovulation on seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. Theriogenology. 2(6): 133-142.
Doyle, S. P., et al. "Artificial insemination of lactating angus cows with sexed semen". Proc. Western Sect. Am.Soc.Anim. Sci. 50:203. 1999
Duchamp, G., Bour, B., Combamous, Y. and Palmer, E. 1987. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. J. Reprod. Fert. Suppl. 35:221-228.
Evans, M.J. and Irvine, C.H.G. 1977. Induction of follicular development, maturation and ovulation by gonadotropin releasing hormone administration to acyclic mares. Bio. Reprod. 16:452-462.
Ferrell, C. L. and T. G. Jenkins. "Energy-Utilization by Mature, nonpregnant, nonlactating cows of different types" J. Anim. Sci. 58:234. 1984
Ferrell, C. L. "Effects of post-weaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. J. Anim. Sci. 55:1272. 1982
Field, R. A., et al., "Bone-ossification and carcass characteristics of wethers given silastic implants containing estradiol". J. Anim. Sci. 68:3663-3668. 1990
Field, R., R. et al., "Growth, carcass, and tenderness characteristics of virgin, spayed, and single-calf heifers.", J. Anim. Sci. 74:2178. 1996
Fitzgerald, B.P., Peterson, K.D. and Silvia, P.J. 1993. Effect of constant administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist on reproductive activity in mares: Preliminary evidence on suppression of ovulation

during the breeding season. Am. J. Vet. Res. 54:1746-1751.
Fluharty, F. L., et al., "Effect of weaning and diet on growth of calves." Research and Reviews. The Ohio State University Department of Animal Sciences. 1996
Fluharty, F.L., et al., "Effects of Age at Weaning and Diet on Growth of Calves", Ohio Agri. Res. and Dev. Circular, 1996, 156: 29.
Foulkes, J.A., Stewart, D.L. and Herbert, C.N. 1977. Artificial insemination of cattle using varying numbers of spermatozoa. Vet. Rec. 101:205.
Fugger, E.F., "Clinical Experience with Flow Cytometric Separation of Human X- and Y- Chromosome Bearing Sperm", Theriogenology, Vol. 52, pp. 1435-1440 (1999)
Fulwyler, M.J. 1965. Electronic separation of biological cells by volume. Science. 150:910.
Fulwyler, M.J. 1977. Hydrodynamic orientation of cells. J Histochem. Cytochem. 25:781-783.
Seidel, G.E.. Jr., "Artificial Insemination With X-and Y-Bearing Bovine Sperm", Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO; Germplasm and Gamete Physiology Lab, ARS, USDA, Beltsville, MD; Atlantic Breeders Coop, Lancaster, PA; DUO Diary, Loveland, CO, USA January 1996.
Garner, D.L., Gledhill, B.L., Pinkel, D., Lake, S., Stephenson, D., Van Dilla, M.A. and Johnson, L.A. 1983. "Quantification of the X and Y chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry". Biol. Reprod. 28:312-321.
Ginther, O.J. 1983. Sexual behavior following introduction of a stallion into a group of mares. Theriogenology. 19:877.
Ginther, O.J. 1992. In: Reproductive Biology of the Mare. (2nd Ed.) Equiservices, Cross Plains, WI.
Gledhill, B.L. 1988. Gender preselection: historical, technical and ethical perspective. Semin Reprod. Endocrinol. 6:385-395.
Gombe, S. and Hansel, W. "Plasma luteinizing-hormone (LH) and progesterone levels in heifers on restricted energy intakes." J. Anim. Sci. 37:728. 1973
Gourley, D.D. and Riese, R.L. 1990. Laparoscopic artificial insemination in sheep. Vet. Clin. N. Amer: Food Anim. Prac. 6(3):615-633.
Gravert, H. O., "Genetic Aspects of Early Calving." In: J.C. Taylor (Ed.) The early calving of heifers and it's impact on beef production. 59. 1975
Gregory, K. E., et al., "Characterization of biological types of cattle III .2." Growth-rate and puberty in females. J. Anim. Sci. 49:461. 1979
Grimes, I. F, and T. B. Turner. "Early weaning of fall

born calves II." Post weaning performance of early and normal-weaned calves. I. Prod. Agric. 4:168. 1991
Grondahl, C., et al, "In Vitro Production of Equine Embryos", Biology of Reproduction, Monograph Series I, pp. 299-307 (1995)
Guillou, F. and Combamous, Y. 1983. Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. Biochem. Biophys. Acta. 755:229-236.
Gurnsey, M.P., and Johnson, L.A., "Recent improvements in efficiency of flow cytometric sorting of X and Y-chromosome bearing sperm of domestic animals: a review", 1998, New Zealand Society of Animal Protection, three pages.
Hall, J. B., et al., "Effect of age and pattern of gain on induction of puberty with a progestin in beef heifers." J. Anim. Sci. 75:1606. 1997
Hamano, K., et al., "Gender Preselection in Cattle with Intracytoplasmically Injected, Flow Cytometrically Sorted Sperm Heads", biology of Reproduction 60, 1999, pp. 1194-1197.
Harrison, L.A., Squires, E.L. and McKinnon, A.O. 1991. Comparison of hCG, busserelin and luprostitol for induction of ovulation in cycling mares. Eq. Vet. Sci. 3:163-166.
Harte, F. J. "System of production of beef from once calved heifers." In: J.C. Taylor (Ed.) The early calving of heifers and its impact on beef production. 123. 1975
Hawk, H.W., et al., "Fertilization Rates in Superovulating Cows After Deposition of Semen on the Infundibulum Near the Uterotubal Junction or After Insemination with High Numbers of Sperm", XP-002103478, Theriogenology, May 1988, Vol. 29, No. 5, pp 1131-1142.
Hemlesmeyer, G. N., et al. "Effects of lactation and prenatal androgenization on the performance, carcass composition and longissimus muscle sensory characteristics of heifers in the single-calfheifer system." The Professional Animal Scientist 15:14. 1999
Hennegmeyer, G. N., et al. "Effects of prenatal androgenization and implantation on the performance and carcass composition of lactating heifers in the single-calfheifer system." The Professional Animal Scientist 15:173. 1999
Hilton, G. G., et al., "An evaluation of current and alternative systems for quality grading carcasses of mature slaughter cows." J. Anim. Sci. 76:2094. 1998
Ho, L., et al., "Influence of gender, breed and age on maturity characteristics of sheep." J. Anim. Sci. 67:2460-2470. 1989
Hofferer, S., Lecompte, F., Magallon, T., Palmer, E. and Combamous, Y. 1993. Induction of ovulation and

superovulation in mares using equine LH and FSH separated by hydrophobic interaction chromatography. J. Reprod. Fert. 98:597-602.
Hohenboken, W. D. "Applications of sexed semen in cattle production." Therio.52:1421. 1999
Holtan, D.W., Douglas, R.H. and Ginther, O.J. 1977. Estrus, ovulation and conception following synchronization with progesterone, prostaglandin F2 ct and human chorionic gonadotropin in pony mares. J. Anim. Sci. 44:431-437.
Householder, D.D., Pickett, B.W., Voss, J.L. and Olar, T.T. 1981. Effect of extender, number of spermatozoa and hCG on equine fertility. J. Equine Vet. Sci. 1:9-13.
Howard, J.G., Bush, M., Morton, C., Morton, F., Wentzel, K. and Wildt, D.E. 1991. Comparative semen cryopreservation in ferrets (<i>Mustela putorius furo</i>) and pregnancies after laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. J. Reprod. Fert. 92:109-118.
Howard, J.G., Roth, T.L., Byers, A.P., Swanson, W.F. and Wildt, D.E. 1997. Sensivity to exogenous gonadotropins for ovulation and laparoscopic artificial insemination in the theetab and clouded leopard. Biol. Reprod. 56:1059-1068.
Hunter, R.H.F. 1980. Transport and storage of spermatozoa in the female reproductive tract. Proc 4 th Int. Congr. Artira. Repro. and A.I. 9:227-233.
Hyland, J.H., Ainsworth, C.G.V. and Langsford, D.A. 1988. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) delivered by continuous infusion induces fertile estrus in mares during seasonal acyclicity. Proc. Amer. Assoc. Eq. Prac. 181-190.
Irvine, C.H.G. and Alexander, S.L. 1993. In: Equine Reproduction. Edited by McKirmon and Voss. Lea and Febiger. Philadelphia, London. pp. 37.
Jafar, et al.: "Sex Selection in Mammals: A Review", Theriogenology, vol. 46, 1996, pp 191-200.
Jarriage, R. "Age of cows at first calving in France." J.C. Taylor (Ed.) The early calving of heifers and it's impact on beef production. 10. 1975
Jasko, D.J., Martin, J.M. and Squires, E.L. 1992. Effect of volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. Theriogenology. 37:1233-1239
Johnson L.A., et al., 1987. Flow cytometry of X- and Y-chromosome bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 333-42. Garnete Research 17: 203-212
Johnson, "Gender preselection in Mammals: An overview", Dtsch. Tierarztl. Wschr, Vol. 103, Aug./Sep. 1996, pp 288-291.

Johnson, A.L. 1986. Pulsatile release of gonadotropin releasing hormone advances ovulation in cycling mares. <i>Biol. Reprod.</i> 35:1123E 1130.
Johnson, A.L. and Becker, S.E. 1988. Use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment to induce multiple ovulations in the anestrus mare. <i>Eq. Vet. Sci.</i> 8:130-134.
Johnson, L., "Sex Preselection by Flow Cytometric Separation of X and Y Chromosome-Bearing Sperm Based on DNA Difference: a Review", <i>Reproduction and Fertilization Development</i> 7, 1995, pp. 893-903.
Johnson, L., "Successful Gender Preselection in Farm Animals", <i>Agricultural Biotechnology</i> , 1998, pp. 439-452.
Johnson, L.A. 1988. Flow cytometric determination of spermatozoa sex ratio in semen purportedly enriched for X or Y bearing spermatozoa. <i>Theriogenology</i> . 29:265. abstr.
Johnson, L.A. 1992. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. <i>J Anim. Sci. Suppl</i> 1.70:8-18.
Johnson, L.A. 1994. Isolation of X- and Y-bearing spermatozoa for sex preselection. In: <i>Oxford Reviews of Reproductive Biology</i> . Ed. HH Charlton. Oxford University Press. 303-326.
Johnson, L.A. 1995. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome bearing spermatozoa based on DNA difference: a review. <i>Reprod. Fert. Dev.</i> 7:893-903.
Johnson, L.A. and Schulman, J.D. 1994. The safety of sperm selection by flow cytometry. <i>Hum. Reprod.</i> 9(5):758.
Johnson, L.A., "Sex preselection in porcinos: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow-sorted X- and Y-bearing sperm", <i>Reprod. Domest. Anim.</i> 26:309-314, 1991
Johnson, L.A., and Pinkel, D., "Modification of a Laser-Based flow Cytometer for High-Resolution DNA Analysis of Mammalian Spermatozoa", <i>Cytometry</i> 7, 1986, pp 268 - 273.
Johnson, L.A., et al., "Sex Preselection in Rabbits: Live Births from X and Y Sperm Separated by DNA and Cell Sorting", <i>Exceptional Paper-Rapid Publication</i> , XP-002103476, <i>Biology of Reproduction</i> 41, 199-203, 1989, pp 199-203.
Johnson, L.A., et al., 1994. Improved flow sorting resolution of X- and Y- chromosome bearing viable sperm separation using dual staining and dead cell gating. <i>Cytometry</i> 17 (suppl 7):83.
Johnson, L.A., Flook, J.P., Look, M.V. and Pinkel, D. 1987b. Flow sorting of X and Y chromosome bearing spermatozoa into two populations. <i>Gam. Res.</i> 16:203-212.
Johnson, L.A., Welch, G.R., Rens, W. and Dobrinsky, J.R. 1998. Enhanced flow cytometric sorting of mammalian X

and Ysperm: high speed sorting and orienting no77.1e for artificial insemination. Theriogenology. 49(1):361. abstr.
Joseph, R. L. "Carcass composition and meat quality in once calved heifers." In: J.C. Taylor (Ed.) The early calving of heifers and its impact on beef production. 143. 1975
Joseph, R. L. and J. P. Crowley. "Meat quality of once-calved heifers." Irish J. of Agric. Research 10:281. 1971
Kachel, V., et al., A Uniform Lateral Orientation, Cused by Flow Forces, of Flat Particles in Flow-Through Systems, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1997, Vol. 25, No. 7, pp 774 -780.
Kanayama, K., Sankai, T., Nariaik, K., Endo, T. and Sakuma, Y. 1992b. Pregnancy by means of tubal insemination and subsequent spontaneous pregnancy in rabbits. J. Int. Med. Res. 20:401-405.
Karabinus, et al., "Effects of Egg Yolk-Citrate and Milk Extenders on Chromatin Structured Viability of Cryopreserved Bull Sperm", Journal of Dairy Science, Vol. 74, No. 11, 1999, pp 3836-3848.
Keeling, P. C. B. M. S. T. G. D. I. a. P. W. J., "A modeling study of once-bred heifer beef production." Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 51. 1991
Kilicarslan, M.R., Horoz, H., Senunver, S.C., Konuk, S.C., Tek, C. and Carioglu, B. 1996. Effect of GnRH and hCG on ovulation and pregnancy in mares. Vet. Rec. 139:119-120.
Kinder, J. E., et al. "Endocrine basis for puberty in heifers and ewes." J. Repro. and Fertility 393. 1995
Klindt, J. and J. D. Crouse. "Effect of ovariectomy and ovariectomy with ovarian auto transplantation on feedlot performance and carcass characteristics of heifers." J. Anim. Sci. 68:3481. 1990
Klosterman, E. W. and C. F. Parker. "Effect of size, breed and sex upon feed efficiency in beef cattle." North Central Regional Research Publication 235, Ohio Agric. Research and Development Center 1090:3. 1976
Kniffen, D. M., Wagner, W.R., and Lewis. P.E. "Effects of long-term estrogen implants in beef heifers." J. Anim. Sci. 77:2886. 1999
Koch, R. M., et al., "Characterization of biological types of cattle -Cycle-II .3." Carcass composition, quality and palatability. J. Anim. Sci. 49:448. 1919
Lapin, D.R. and Ginther, O.J. 1977. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. J. Anim. Sci. 44:834-842.

Laster, D. B., "Factors affecting dystocia and effects of dystocia on subsequent reproduction in beef-cattle." J. Anim. Sci. 36:695. 1973
Lawrenz, R. 1985. Preliminary results of non-surgical intrauterine insemination of sheep with thawed frozen semen. J S Afr. Vet. Assoc. 56(2):61-63.
Levinson, G., et al, 1995. DNA-based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the preparation of X-linked disease. Mol. Human Reprod. 10:979-982.
Lindsey, A., et al., AHysteroscopic Insemination of Mares with Nonfrozen Low-dose Unsexed or Sex-sorted Spermatozoa@, currently unpublished, pp. 1-15.
Linge, F. 1972. Faltforsok med djupfrost sperma (field trials with frozen sperm). Farskotsel. 52:12-13.
Loneragan, P., et al., "Effect of Time Interval from Insemination to First Cleavage on the Development of Bovine Embryos In Vitro and In Vivo", Theriogenology, 1999, p. 326
Long, C.R., Rath, D., Welch, G.R., Schreier, L.L., Dobrinsky, J.R. and Johnson, L.A. 1998. AIn vitro production of porcine embryos from semen sorted for sex with a high speed cell sorter: comparison of two fertilization media.@, Theriogenology. 49(1):363. abstr.
Loy, R.G. and Hughes, J.P. 1965. The effects of human chorionic gonadotropin on ovulation, length of estrus, and fertility in the mare. Cornell Vet. 56:41-50.
Lu, K.H., et al., "In Vitro Fertilization with Flow-Cytometrically-Sorted Bovine Sperm", Theriogenology 52, 1999, pp. 1393-1405.
Lynch, I. M., et al., "Influence of timing of gain on growth and reproductive performance ofbeefreplacement heifers." I. Anim. Sci. 75:1715. 1997
Macmillan, K.L. and A.M. Day, "Prostaglandin F2a - A Fertility Drug In Dairy Cattle?,,, Ruakura Animal Research Station, Private Bag, Hamilton, New Zealand, Theriogenology, September 1982, Vol. 18 No. 3, pages 245-253
Martin, A. H., et al., "Characteristics of youthful beef carcasses in relation to weight, age and sex .3. meat quality attributes." Canadian I. Anim. Sci. 51:305. 1971
Martin, L. C., J. S. Brinks, R. M. Bourdon, and L. V. Cundiff. "Genetic-effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction." J. Anim. Sci. 70:4006. 1992
Matsuda, Y. and Tobari, I. 1988. Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light (UV) and methyl and ethyl methanesulfonate (MMS and EMS). Mutat. Res. 198:131-144.
Matulis, R. J., F. K. McKeith, D. B. Faulkner, L. L. Berger, and P. George. "Growth and carcass

characteristics of cull cows after different times-on-feed." <i>J. Anim. Sci.</i> 65:669. 1987
Mauleon, P. "Recent research related to the physiology of puberty." Commission of the European Communities. The early calving of heifers and it's impact on beef production. 1975
Maxwell, W. and Johnson, L., "Chlortetracycline Analysis of Boar Spermatozoa after Incubation, Flow Cytometric Sorting, Cooling, or Cryopreservation", <i>Molecular Reproduction and Development</i> 46, 1997, pp. 408-418.
Maxwell, W.M.C., Evans, G., Rhodes, S.L., Hillard, M.A. and Bindon, B.M. 1993. Fertility of Superovulated Ewes after Intrauterine or Oviductal Insemination with Low Numbers of Fresh or Frozen-Thawed Spermatozoa. <i>Reprod. Fertil. Dev.</i> 5:57-63.
Mccomlick, R. J. "The flexibility of the collagen compartment of muscle." <i>Meat Sci.</i> 36:79. 1994
McCue, P.M. 1996. Superovulation. <i>Vet. Clin. N. Amer. Eq. Prac.</i> 12:1-11.
McCue, P.M., Fleury, J.J., Denniston, D.J., Graham, J.K. and Squires, E.L. 1997. Oviductal insemination in the mare. 7th Int Symp. <i>Eq. Reprod.</i> 133. abstr.
McDonald, L.E. 1988. Hormones of the pituitary gland. In: <i>Veterinary Pharmacology and Therapeutics</i> . 6th ed. Edited by N.H. Booth and L.E. McDonald. Ames, Iowa State Univ. Press. pp. 590.
McKenna, T., Lenz, R.W., Fenton, S.E. and Ax, R.L. 1990. Nonreturn rates of dairy cattle following uterine body or comual insemination. <i>J. Dairy Sci.</i> 73:1179-1783.
McKinnin, A. and Voss, J., "Equine Reproduction", Lea & Febiger, Philadelphia, 1993, pp 291, 299 - 302, 345 - 348, 739 - 797.
McKinnon, A. et al, 1993. Predictable ovulation in mares treated with an implant of the GnRH analogue deslorelin. <i>Eq. Vet. J.</i> 25:321-323.
McKinnon, A.O. et al, 1996. Repeated use of a GnRH analogue deslorelin (Ovuplant) for hastening ovulation in the transitional mare. <i>Eq. Vet. J.</i> 29:153-155.
McNutt, et al., "Flow Cytometric Sorting of Sperm: Influence on Fertilization and Embryo/Fetal Development in the Rabbits", <i>Molecular Reproduction and Development</i> , Vol. 43, 1996, pp 261-267.
Meilgaard, M., G. V. Civile, and B. T. Carr. "Sensor Evaluation Techniques." CRC Press Inc., Boca Raton, FL. 1991
Meinert, C., et al., "Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin", <i>Equine Veterinary Journal</i> , 25, 1993, pp 65 - 68.
Merton, J., et al., "Effect of Flow Cytometrically Sorted

Frozen/Thawed Semen on Success Rate of In Vitro Bovine Embryo Production", <i>Theriogenology</i> 47, 1997, pp. 295.
Meyers, P.J., Bowman, T., Blodgett, G., Conboy, H.S., Gimenez, T., Reid, M.P., Taylor, B.C., Thayer, J., Jochle, W. and Trigg, T.E. 1997. Use of the GnRH analogue, deslorelin acetate, in a slow release implant to accelerate ovulation in oestrous mares. <i>Vet. Rec.</i> 140:249-252.
Michaels, Charles, "Beef A.I. Facilities that work", <i>Proc. Fifth N.A.A.B Tech. Conf. A.I. Reprod. Columbia, MO.</i> pp. 20-22.
Michel, T.H., Rosedale, P.D. and Cash, R.S.G. 1986. Efficacy of human chorionic gonadotrophin and gonadotrophin releasing hormone for hastening ovulation in Thoroughbred mares. <i>Eq. Vet. J.</i> 6:438-442.
Miller, S.J. 1986. <i>Artificial Breeding Techniques in Sheep.</i> In Morrow, D.A. (ed): <i>Current Therapy in Theriogenology</i> 2. Philadelphia, WB Saunders.
Mirskaja, L.M. and Petrapavlovskii, V.V. 1937. The reproduction of normal duration of heat in the mare by the administration of Prolan. <i>Probl. Zivotn. Anim. Breed. Abstr.</i> 5:387.
Moe, P. W., H. F. Tyrrell, and W. P. Flatt. "Energetics of body tissue mobilization." <i>J. of Dairy Sci.</i> 54:548.
Molinia, F.C., Gibson, R.J., Brown, A.M., Glazier, A.M. and Rodger, J.C. 1998. Successful fertilization after superovulation and laparoscopic intrauterine insemination of the brushtail possum, <i>Trichosurus vulpecula</i> , and tammar wallaby, <i>Macropus eugenii</i> . <i>J.Reprod. Fert.</i> 112:9-17.
Moms, S. T., et al., "Biological efficiency: How relevant is this concept to beef cows in a mixed livestock seasonal pasture supply context?" <i>Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production</i> 54:333. 1994
Monensin." <i>J. Anim. Sci.</i> 55:357-362. 1982
Moran, C., J. F. Quirke, and J. F. Roche. "Puberty in heifers -a review." <i>Animal Reproduction Sci.</i> 18:167. 1989
Morcom, C.B. and Dukelow, W.R. 1980. A research technique for the oviductal insemination of pigs using laparoscopy. <i>Lab. Anim. Sci.</i> 1030-1031.
Morgan, J. B., et al., "National beef tenderness survey." <i>J. Anim. Sci.</i> 69:3274. 1991
Morris, L.H., et al., "Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares", <i>Journal of Reproduction and Fertility</i> , Vol. 118, pp. 95-100 (2000)
Moseley, W. M., et al., 1982. "Relationship of Growth and Puberty in Beef Heifers Fed
Mount, D. E. "Fibrous and non-fibrous carbohydrate supplementation to ruminants grazing forage from small

grain crops." M.S. Thesis. Colorado State University. 2000
Muller, W. and Gautier, F. 1975. Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. Euro. J Biochem. 54:358.
Munne, S. 1994. Flow cytometry separation of X and Y spermatozoa could be detrimental to human embryos. Hum. Reprod. 9(5):758
Myers, S. E., "Performance and carcass traits of early-weaned steers receiving either a pasture growing period or a finishing diet at weaning." J. Anim. Sci. 77:311. 1999
Myers, S. E., et al., "Comparison of three weaning ages on cow-calf performance and steer carcass traits." J. Anim. Sci. 77:323. 1999
Myers, S. E., et al., "Production systems comparing early weaning to normal weaning with or without creep feeding for beef steers." J. Anim. Sci. 77:300. 1999
Nix, I. P., I. C. Spitzer, and P. I. Chenoweth. "Serum testosterone concentration, efficiency of estrus detection and libido expression in androgenized beef cows." Therio. 49: 1195. 1998
Nowshari, et al., "Superovulation of Goats with Purified pFSH Supplemented with Defined Amounts of pLH", Theriogenology, Vol 43, 1995, pp 797-802.
Nowshari, et al., Theriogenology, Vol 43, 1995, pp 797-802.
NRC. Nutrient requirements for beef cattle. National Academy of Sci. National Research Council, Washington, DC. 1996
Olson, S.E. and Seidel, G.E. Jr., "Reduced Oxygen Tension and EDTA improve Bovine Zygote Development in a Chemically Defined Medium", Journal of Animal Science 78, 2000, pp. 152-157.
Owen, J. B. "The maiden female-a means of increasing meat production." Proc. Symp. on the use of once bred heifers and gilts. 1973
Pace, M.M. and Sullivan, J.J. 1975. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on pregnancy rates in mares inseminated with frozen stallion semen. J Reprod. Fert. Suppl. 23:115-121.
Parent US Application 09/001,394, entitled "Sheath Fluids and Collection Systems for Sex-Specific Cytometer Sorting of Sperm", filed on December 31, 1997, 87 total pages which includes four drawings.
Parrish, J., et al., "Capacitation of Bovine Sperm by Heparin", Technology of Reproduction 38, 1988, pp. 1171-1180.
PCT application , PCT/US99/17165, filed 28 July 1999, entitled "Equine System for Non-Surgical Artificial

Insemination".
PCT application, PCT/US98/27909, filed 31 December 1998, entitled "Commercially Practical Sex-Specific Insemination of Mammals".
Peippo, J., et al., "Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction", <i>Theriogenology</i> , Vol. 44 619-627 (1995)
Perry, E.J. 1968. Historical Background In: <i>The Artificial Insemination of Farm Animals</i> . 4th ed. Edited by E.J. Perry. New Brunswick, Rutgers University Press, pp. 3-12.
Petersen, G.A., et al, "Cow and Calf Performance and Economic Considerations of Early Weaning of Fall-Born Beef Calves", <i>J. Anim. Sci.</i> , 1987, 64:15, pp 15-22.
Petit, M. "Early Calving in Suckling Herds." In: (Ed.) J.C. Taylor. <i>The early calving of heifers and it's impact on beef production</i> . 157. 1975
Pickett GW, et al., "Management of the mare for maximum reproductive efficiency", Bulletin No. 6 Colorado State University, Ft. Collins CO. (1989)
Pickett, B.W, et al., 1976. Factors influencing the fertility of stallion spermatozoa in an A.I. program. Proc. 8 th Internat. Congr. Anim. Reprod. A.I. Krakow, Poland. 4: 1049 - 1052.
Pickett, B.W. and Back, D.G. 1973. Procedures for preparation, collection, evaluation and insemination of stallion semen. C.S.U. Exp. Sta. Artira. Reprod. Lab. Gen. Series Bull. 935.
Pickett, B.W., and Shiner, K.A., "Recent developments in artificial insemination in horses", <i>Livestock Production Science</i> , 40, 1994, pp 31 - 36.
Pickett, B.W., Burwash, L.D., Voss, J.L. and Back, D.G. 1975b. Effect of seminal extenders on equine fertility. <i>J. Anim. Sci.</i> 40:1136-1143.
Pinkel, D., et al, "Flow Cytometric Determination of the Proportions of X- and Y- Chromosome-Bearing Sperm in Samples of Purportedly Separated Bull Sperm", <i>Journal of Animal Science</i> , Vol. 60, No. 5, 1985, pp 1303 - 1307.
Pinkel, D., Gledhill, B.L., Van Dilla, M.A., Stephenson, D. and Watchmaker, G. 1982b. High resolution DNA measurements of mammalian spermatozoa. <i>Cytometry</i> . 3:1-9. (1982b)
Polge, E. J., "Historical Perspective of AI: Commercial Methods of Producing Sex Specific Semen, IVF Procedures", <i>Proceedings of the 16th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction</i> , Cambridge, England, 1996, pp. 7-11.
Purvis, H. T. and J. C. Whittier. "Effects of ionophore feeding and anthelmintic administration on age and weight at puberty in spring-born beef heifers." <i>J. Anim. Sci.</i>

74:736-744. 1996
Randel, R. D. "Nutrition and postpartum rebreeding in cattle." J. Anim. Sci. 68:853. 1990
Rath, D., et al., "Low Dose Insemination Technique in the Pig", Boar Semen Preservation IV, 2000, pp. 115-118.
Rath, D., et al., "Production of Piglets Preselected for Sex Following in Vitro Fertilization with X and Y Chromosome-Bearing Spermatozoa Sorted by Flow Cytometry", Theriogenology, 47, 1997, pp 795 - 800.
Reiling, B.A., et al., "Effect of Prenatal Androgenization on Performance, Location, and Carcass and Sensory Traits on Heifers in Single Calf Heifer System", J. Anim. Sci., 1995, 73: 986, pp 986-992.
Rens, W., et al, "A Novel Nozzle for More Efficient Sperm Orientation to Improve Sorting Efficiency of X and Y Chromosome-Bearing Sperm", Cytometry 33, 1998, pp. 476-481
Rens, W., et al., "Improved Flow Cytometric Sorting of X- and Y- Chromosome Bearing Sperm: Substantial Increase in Yield of Sexed Semen", Molecular Reproduction and Development, 1999, pp 50-56.
Rieger, D., et al, "The Relationship Between the Time of First Cleavage of Fertilized Cattle Oocytes and Their Development to the Blastocyst Stage", Theriogenology, 1999, pp. 190.
Ritar, A. and Ball, A. 1991. Fertility of young cashmere goats after laparoscopic insemination. J. Agr. Sci. 117:271-273.
Roberts, J.R. 1971. In: <i>Veterinary Obstetrics and Genital Diseases</i> . Ithaca, New York. pp. 740-749.
Romita, A. "Some considerations on the beef situation in Italy." (Ed.) J.C. Taylor. The early calving of heifers and it's impact on beef production. 23. 1975
Roth, T.L., Wolfe, B.A., Long, J.A., Howard, J. and Wildt, D.E. 1997. Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. Bio Reprod. 57:165-171.
Roux, M., J. H. Teissier, J. Bonnemaire, and R. Dumont. "Early calving heifers versus maiden heifers for beef -production from dairy herds. 1." The effects of genotype (Friesian and Charolais x Friesian) and 2 feeding levels in the rearing period on growth and carcass quality. Livestock Prod. Sci.16:1. 1987
Rowley, H-S., Squires, E.L. and Pickett, B.W. 1990. Effect ofinsemination volume on embryo recover}' in mares. J. Equine Vet. Sci. 10:298-300.
Roy, J. H. B. "Rearing dairy-herd replacements." J. of the Soc. ofDairy Technology 31:73-79. 1978

Rutter, L. M., et al., "Effect of abomasal infusion of propionate on the GnRH-induced luteinizing-hormone release in prepuberal heifers." J. Anim. Sci. 56:1167. 1983
Salamon, S. 1976. <i>Artificial Insemination of Sheep</i> . Chippendale, New South Wales. Publicity Press. p.83-84.
Salisbury, G.W. and VanDemark, N.L. 1961. <i>Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle</i> . San Francisco: Freeman and Company.
SAS, SAS/STAT, "User's Guide (Release 6.03)", SAS Inst. Inc., Cary, NC., 1988. 3 pages
SAS. "The SAS System for Windows." Ver 7.0. ReI 6.12. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2000
Schenk, J. L., T. K. Suh, D. G. Cran, and G. E. Seidel. "Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa." Therio. 52:1375. 1999
Schenk, J.L. and Seidel, Jr., G.E., "Imminent Commercialization of Sexed Bovine", Proceedings, The Range Beef Cow Symposium XVI, 1999, pp 89-96.
Schillo, K. K., J. B. Hall, and S. M. Hileman. "Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer." J. Anim. Sci. 70:3994. 1992
Schmid R.L., et al, "Fertilization with Sexed Equine Spermatozoa Using Intracytoplasmic Sperm Injection and Oviductal Insemination", 7th International Symposium On Equine Reproduction, pp. 139 (Abstract) (1998)
Schnell, T. D., K. E. Belk, J. D. Tatum, R. K. Miller, and G. C. Smith. "Performance, carcass, and palatability traits for cull cows fed high-energy concentrate diets for 0, 14, 28, 42, or 56 days." J. Anim. Sci. 75:1195. 1997
Schoonmaker, J. P., et al., "Effects of age at weaning and implant strategy on growth of steer calves." J. Anim. Sci. (Suppl2) 76:71 (Abstr.). 1998
Seidel, G. E. and L. A. Johnson. "Sexing mammalian sperm -overview." Therio. 52: 1267. 1999
Seidel, G. E., "Insemination of heifers with sexed sperm." Therio. 52:1407. 1999
Seidel, G.E. Jr., "Uterine Horn Insemination of Heifers With Very Low Numbers of Nonfrozen and Sexed Spermatozoa", Atlantic Breeders Cooperative, Theriogenology 48: pp. 1255-1264, (1997)
Seidel, G.E. Jr., Cran, D.G., Herickoff, L.A., Schenk, J.L., Doyle, S.P. and Green, R.D. 1999. Insemination of heifers with sexed frozen or sexed liquid semen. Theriogenology. 51. (in press). abstr.(1999)
Seidel, G.E., Jr., et al, "Artificial Insemination With X-and Y-Bearing Bovine Sperm", Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO; Germplasm and Gamete Physiology Lab, ARS, USDA, Beltsville, MD; Atlantic Breeders Coop, Lancaster,

PA; DUO Dairy, Loveland, CO, USA January 1996.
Seidel, G.E., Jr., et al, "Insemination Of Heifers With Very Low Numbers Of Frozen Spermatozoa." , Colorado State University, Fort Collins, Atlantic Breeders Cooperative, Lancaster, PA, DUO Dairy, Loveland, CO, July 1996.
Seidel, Jr., G. E., et al, "Insemination of Holstein Heifers With Very Low Numbers Of Unfrozen Spermatozoa", Colorado State University, Atlantic Breeders Cooperative, (1995)
Seidel, Jr., G.E.et al, "Insemination Of Heifers With Very Low Numbers Of Frozen Spermatozoa", Colorado State University (1996)
Sell, R. S., D. L. Watt, R. D. Little, and T. A. Petry. "Single-calfheifer profitability compared to other north dakota beef production systems." Department of Ag. Eco., North Dakota State University, Ag. Econ. Rpt. 20.
Senger, P.L., Becker, W.C., Davidge, S.T., Hillers, J.K. and Reeves, J.J. 1988. Influence of comual insemination on conception rates in dairy cattle. J Anim. Sci. 66:3010-3016.
Shackelford, S. D., M. Koohmaraie, and T. L. Wheeler. "Effects of slaughter age on meat tenderness and usda carcass maturity scores of beef females." I. Anim. Sci. 73:3304. 1995
Shelton, J.N. and Moore, N.W. 1967. The response of the ewe tot pregnant mare gonadotropin and to horse anterior pituitary extract. J. Reprod. Fert. 14:175 - 177.
Shilova, A.V., Platov, E.M. and Lebedev, S.G. 1976. The use of human chorionic gonadotrophin for ovulation date regulation in mares. VIIIth Int. Congr. On Anim. Repro. and A.I. 204-208.
Shorthose, W. R. and P. V. Harris. "Effect of animal age on the tenderness of selected beef muscles." I. Food Sci. 55:1-. 1990
Silbennann, M., "Honnonnes and Cartilage. Cartilage: development, differentiation, and growth." pp. 327-368. Academic Press, Inc. 1983
Simon, M., "The effect of management option on the perfonnance of pregnant feedlot heifers." M.S. Thesis. Kansas State University. 1983
Smith, G. C., B. W. Berry, J. W. Savell, and H. R. Cross. "USDA maturity indexes and palatability ofbeefrib steaks." J. of Food Quality 11 :1. 1988
Smith, G. C., et al., "Relationship ofusda maturity groups to palatability of cooked beef." J. of Food Sci. 47:1100. 1982
Squires, E., "Simultaneous Analysis of Multiple Sperm Attributes by Flow Cytometry□, Diagnostic Techniques and Assisted Reproductive Technology, The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice, Vol. 12, No. 1, April

1996, pp127 - 130.
Squires, E.L., Moran, D.M., Farlin, ME., Jasko, D.J., Keefe, T.J., Meyers, S.A., Figueiredo, E., McCue, P.M. and Jochle, W. 1994. Effect of dose of GnRH analogue on ovulation in mares. <i>Theriogenology</i> . 41:757-769.
Squires, E.L., "Early Embryonic Loss in Equine Diagnostic Ultrasonography", 1 st Ed. pp 157-163 Eds Rantanen & McKinnon. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland (1998)
Squires, E.L., et al, "Cooled and frozen stallion semen", Bulletin No. 9, Colorado State University, Ft. Collins, CO. (1999)
Stellflug, J. N., D. K. Ran, R. D. Randel, and Eo L. Moody. "Plasma estrogens in peri-parturient cow." <i>Therio</i> 10:269. 1978
Stevenson, J. S., M. W. Smith, J. R. Jaeger, L. R. Corah, and D. G. Lefever. "Detection of estrus by visual observation and radiotelemetry in peripubertal, estrus-synchronized beefheifers." <i>J. Anim. Sci.</i> 74:729. 1996
Story, C. E., R. J. Rasby, R. T. Clark, and C. T. Milton. "Age of calf at weaning of spring-calving beef cows and the effect on cow and calf performance and production economics." <i>J. Anim. Sci.</i> 78:1403. 2000
Sullivan, J.J., Parker, W.G. and Larson, LL. 1973. Duration of estrus and ovulation time in nonlactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrous periods. <i>J.A.V.M.A.</i> 162:895-898.
Swanson, E. W. "Future research on problems of increasing meat production by early calving." <i>Comm. Eur. Commun.</i> , Eur. 5545.1975. The Early Calving of Heifers and its Impact on Beef Production.
Taljaard, T.L., Terblanche, S.J., Bertschinger, H.J. and Van Vuuren, L.J. 1991. The effect of the laparoscopic insemination technique on the oestrus cycle of the ewe. <i>J. S Afr. Vet. Assoc.</i> 62(2):60-61.
Tatum, J. D., G. C. Smith, B. W. Berry, C. E. Murphey, F. L. Williams, and Z. L. Carpenter. "Carcass characteristics, time on feed and cooked beef palatability attributes." <i>J. Anim. Sci.</i> 50:833. 1980
Taylor, C.S., Moore, A.J. Thiessen, R.B. and Bailey, C.M., AFRC Animal Breeding Research Organisation, West Mains Road, Edinburg EH9 3JQ, "Efficiency of Food Utilization in Traditional and Sex-Controlled Systems of Beef Production", pp 401-440.
Taylor, S. C. S., A. J. Moore, R. B. Thiessen, and C. M. Bailey. "Efficiency of food utilization in traditional and sex-controlled systems of beef-production." <i>Animal Production</i> 40:401. 1985
Tervit, H.R., et al., "Successful Culture In Vitro of

Sheep and Cattle Ova", Agricultural Research Council, Unit of Reproduction Physiology and Biochemistry, University of Cambridge, 1972, p. 493-497.
Unruh, J. A. "Effects of endogenous and exogenous growth-promoting compounds on carcass composition, meat quality and meat nutritional-value." J. Anim. Sci. 62:1441. 1986
US Application , 09/454,488, entitled "Improved Flow Cytometer Nozzle and Flow Cytometer Sample Handling Methods", filed December 3, 1999.
US Application , 60/238,294, entitled "Hysteroscopic Insemination of Mares" filed October 5, 2000.
US Application , 09/448,643, entitled "Multiple Sexed Embryo Production System for Mammals", filed November 24, 1999.
US Application , 09/511,959 entitled "Methods For Improving Sheath Fluids and Collection Systems For Sex-Specific Cytometer Sorting of Sperm", filed February 23, 2001.
US Application 09/001,394, entitled "Sheath Fluids and Collection Systems for Sex-Specific Cytometer Sorting of Sperm", filed on December 31, 1997, 87 total pages which includes four drawings.
US Application 09/015, 454, entitled "System for Improving Yield of Sexed Embryos in Mammals", filed on January 29, 1998, 59 total pages which includes drawings.
US Application 60/211093, entitled "Integrated System for Herd Management Using Sexed Semen", filed June 12, 2000.
US Application entitled "System For Separating Frozen-Thawed Sperm Cells Into X-Chromosome And Y-Chromosome Bearing Populations", filed November 28, 2000.
US Application Serial Number 60/094,720, entitled "System for Low Dose Insemination of Equines", filed July 30, 1998.
US Application Serial Number 60/113,143, entitled "Equine Insemination System", December 18, 1998.
US Application Serial Number 60/203,089, entitled "Detector System for Resolving Small Differences in Photo-generated Signal", filed May 9, 2000.
US Application Serial Number 60/211093, entitled "Integrated System for Herd Management Using Sexed Semen", filed June 12, 2000.
US Application Serial Number 60/224,050., entitled "Integrated System for Herd Management With Terminal-Cross Program Using Sexed Semen", filed August 9, 2000.
USDA "Official United States standards for grades of carcass beef." Agric, Marketing Serv., USDA .Washington, DC. 1997
Vazquez, J. et al., "Nonsurgical Uterotubal Insemination

in the Mare", Proceedings of the 44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Baltimore, Maryland, December 6-9, 1998, Vol. 44, pp 68-69
Vazquez, J., et al., "A.I. in Porcinos; New Strategy for Deep Insemination with Low Number of Spermatozoa Using a Non-surgical Methodology", 14th International Congress on Animal Reproduction, Vol. 2, Stockholm, July, 2000, p. 289.
Vazquez, J., et al., "Development of a Non-surgical Deep Intra Uterine Insemination Technique", IV International Conference on Boar Semen Preservation, Maryland, August, 1999, p 35 and photo of display board.
Vazquez, J., et al., "Successful Low-Dose Insemination by a Fiberoptic Endoscope Technique in the Sow ", Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Netherlands, Theriogenology, Vol. 53, January, 2000, pp. 201.
Vazquez, J., et al., "Hypoosmotic Swelling Test as Predictor of the Membrane Integrity in Boar Spermatozoa", Boar Semen Preservation IV, IVth International Conference on Boar Semen Preservation, Maryland, pp. 263.
Vidament, M., Dupere, A.M., Julianne, P., Evain, A., Noue, P. and Palmer, E. 1997. Equine frozen semen freezability and fertility field results. Theriogenology. 48:907.
Vincent, B. C., S. D. M. Jones, L. E. Jeremiah, M. A. Price, and J. A. Newman. "Carcass characteristics and meat quality of once-calved heifers." Canadian J. Anim. Sci. 71:311. 1991
Voss, J.L. and Pickett, B.W. 1976. Reproductive management of the broodmare. C.S.U. Exp. Sta. Anim. Reprod. Lab. Gen. Series. Bull. 1-12
Voss, J.L., Pickett, B.W., Burwash, L.D. and Daniels, W.H. 1974. Effect of human chorionic gonadotropin on duration of estrous cycle and fertility of normally cycling, nonlactating mares. J.A.V.M.A. 165:704-706.
Voss, J.L., Squires, E.L., Pickett, B.W., Shideler, R.K. and Eikenberry, D.J. 1982. Effect of number and frequency of inseminations on fertility in mares. J. Reprod. Fertil. Suppl. 32:53-57.
Waggoner, A. W., M. E. Dikeman, I. R. Brethour, and K. E. Kemp. "Performance, carcass, cartilage calcium, sensory and collagen traits of longissimus muscles of open versus 30-month-old heifers that produced one calf." I. Anim. Sci. 68:2380. 1990
Welch G.R., et al., 1994. Fluidic and optical modifications to a FACS IV for flow sorting of X- and Y-chromosome bearing sperm based on DNA. Cytometry 17 (suppl. 7): 74.

Welch, G., et al., "Flow Cytometric Sperm Sorting and PCR to Confirm Separation of X- and Y- Chromosome Bearing Bovine Sperm", Animal Biotechnology, 6 (2), 131-139, 1995, pp 131 - 139.
Wheeler, T. L., L. v. Cundiff, and R. M. Koch. "Effect of marbling degree on beef palatability in Bos- Taurus and Bos-Indicus cattle." J. Anim. Sci. 72:3145. 1994
Wickersham, E. W. and L. H. Schultz. "Influence of age at first breeding on growth, reproduction, and production of well-fed holstein heifers." J. Dairy Sci. 46:544. 1963
Wilson, C.G., Downie, C.R., Hughes, J.P. and Roser, J.F. 1990. Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares. Eq. Vet. Sci. 4:301-308.
Wilson, M.S. 1993. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. J.Reprod. Fert Suppl. 47:307-311.
Woods, J. and Ginther, O.J. 1983. Recent studies related to the collection of multiple embryos in mares. Theriogenology. 19:101 - 108.
Woods, J., Bergfelt, D.R. and Ginther, O.J. 1990. Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. Eq. Vet. J. 22(6):410-415.
XP-002103478, File Biosis, one page.

Además, para cada término utilizado debe entenderse que a no ser que su utilización en esta solicitud sea inconsistente con tal interpretación, la definiciones comunes del diccionario deben ser entendidas tal como son incorporadas para cada término de todas sus definiciones, términos alternativos y sinónimos tales como los contenidos en el diccionario Random House Webster's Unabridged, la segunda edición que es incorporada a la presente a modo de referencia. Sin embargo a cada uno de lo mencionado anteriormente, para la extensión de tal información o divulgación incorporada a modo de referencia debe ser

considerada inconsistente con el patentamiento de estas invenciones cuyas divulgaciones son expresamente no consideradas realizadas por el solicitante.

Además, a no ser que el contexto lo requiera de otra manera, debe entenderse que el término comprende variaciones tales como comprendiendo o comprenden, están dirigidas para significar la inclusión de un elemento mencionado o paso o grupo de elementos o pasos pero no la exclusión de cualquier otro elemento o paso o grupo de elementos o pasos. Tales términos deben ser interpretados en su forma más expansiva para alcanzar para otorgar al solicitante la cobertura legal mas amplia posible en países tales como Australia y lo similar.

De esta manera el solicitante debe entender que tiene el soporte para reivindicar al menos: i) cada uno de los procedimientos de pigmentación, separación, aislamiento, inseminación o fertilización tal como es descrito aquí y divulgado, ii) los métodos relacionados divulgados y descritos, iii) variaciones similares y equivalentes o incluso implícitos de cada uno de estos dispositivos y métodos, iv) aquellos diseños alternativos los cuales realizan cada uno de las funciones ilustradas que son divulgadas y descritas, v) aquellos diseños alternativos y métodos los cuales realizan cada una de las funciones ilustradas las cuales son implícitas para

realizar aquella la cual es divulgada y descrita, vi) cada característica, componente y fase ilustrada como invención separada e independiente, vii) las solicitudes mejoradas por varias disposiciones o componentes divulgados, viii) los productos resultantes producidos por tales disposiciones y componentes, ix) métodos y aparatos especialmente descritos aquí anteriormente y con referencia a cualquiera de los ejemplos acompañantes, y x) varias combinaciones y permutaciones de cada uno de los elementos divulgados.

Las reivindicaciones mencionadas en esta solicitud son aquí incorporadas a modo de referencia como parte de la descripción de la invención, y el solicitante se reserva expresamente el derecho de utilizar todos o una porción de tal contenido incorporado en tales reivindicaciones como descripción adicional para soportar cualquiera de todas las reivindicaciones o cualquier elemento o componente de las mismas, y el solicitante además se reserva expresamente el derecho de mover cualquier porción de, o la totalidad de, el contenido incorporado de tales reivindicaciones o cualquier elemento componente de las mismas, desde la descripción hasta las reivindicaciones o viceversa en medida que sea necesario para definir el objeto por el cual se pretende protección por medio de esta solicitud o por cualquier solicitud subsiguiente de continuación, división

o solicitud de mejor con respecto a la misma, o para obtener cualquier beneficio, reducción de tasas, en base a o para cumplir con las leyes, reglas o regulaciones de patentes de cualquier país o tratado, y dicho contenido incorporado a modo de referencia permanecerá vigente durante la totalidad de la vigencia de esta solicitud incluyendo cualquier solicitud subsiguiente de continuación, división, o solicitud adicional o de mejora referida a la misma o cualquier extensión o re-concesión de la misma.

REIVINDICACIONES CORREGIDAS

1. Un método que comprende las etapas de :
 - a) recolectar oocitos de un mamífero no humano hembra
 - b) suspender dichos oocitos en un medio de fertilización;
 - c) transferir dichos oocitos en dicho medio de fertilización en una pajilla;
 - d) sellar dicha pajilla que contiene dichos oocitos
 - e) transferir dicha pajilla dentro de un elemento de incubación;
 - f) establecer condiciones de incubación dentro de dicho elemento de incubación;
 - g) sellar dicho elemento de incubación y
 - h) transportar dicho elemento de incubación a otro sitio.
2. Un método como se describió en la reivindicación 1, en donde dicho mamífero no humano hembra se selecciona del grupo que consiste de bovinos, ovinos, equinos, cerdos, y delfines.
3. Un método como se describió en la reivindicación 1, en donde dicho medio de fertilización comprende un medio de Tyrode modificado, suplementado con 0.6% de seroalbúmina bovina, 20 µg de eparina por mililitro por medio de Tyrode, y una concentración de cafeína 5 milimolar.

4. Un método como se describió en la reivindicación 1, en donde entre 10 y 15 de dichos oocitos están contenidos en 50 microlitros de dicho medio de fertilización.
5. Un método como se describió en la reivindicación 1, en donde dicha pajilla tiene elementos de abertura sellables con calor.
6. Un método como se describió en la reivindicación 5, en donde dicha pajilla tiene un volumen interior de 0.25 mililitros.
7. Un método como se describió en la reivindicación 1, en donde dicho elemento de incubación tiene elementos de abertura sellables.
8. Un método como se describió en la reivindicación 7, en dicho elemento de incubación comprende un tubo de vidrio.
9. Un método como se describió en la reivindicación 1, en donde dichas condiciones de incubación comprenden una atmósfera de 5% de dióxido de carbono en aire y una temperatura de 35 grados dentro de dicho elemento de incubación.
10. Un método como se describió en la reivindicación 1, que comprende además la etapa de transferir células de esperma a dicha pajilla que contiene dichos oocitos en dicho medio de fertilización.
11. Un método como se describió en la reivindicación 10, en donde dicha etapa de transferir células de esperma a dicha pajilla que contiene dichos oocitos

comprende establecer una concentración de células de esperma en dicho medio de fertilización de 1 millón a 2 millones por mililitro de medio de fertilización.

12. Un método como se describió en la reivindicación 1, que comprende además la etapa de separar los espermatozoides en poblaciones enriquecidas que llevan cromosoma X y cromosoma Y.

13. Un método como se describió en la reivindicación 12, que comprende además la etapa de transferir células separadas de esperma a dicha pajilla que contiene oocitos.

14. Un método como se describió en la reivindicación 13, en donde dicha etapa de transferir células de esperma separadas a dicha pajilla que contiene oocitos comprende establecer una concentración de dichas células de esperma separadas en dicho medio de fertilización de 1 millón a 2 millones por mililitro de medio de fertilización.

15. Un método como se describió en la reivindicación 10, 11, 12, 13 o 14, que comprende además la etapa de transferir dicha pajilla que contiene dichos oocitos a dicho elemento de incubación.

16. Un método como se describió en la reivindicación 15, que comprende además la etapa de establecer condiciones de fertilización dentro de dicho elemento de incubación.

17. Un método como se describió en la reivindicación 16, en donde dicha etapa de establecer condiciones de fertilización dentro de dicho elemento de incubación comprende una atmósfera de 5% de dióxido de carbono en aire a una temperatura entre 37 °C y 41 °C para una duración de 18 horas a 20 horas.
18. Un método como se describió en la reivindicación 16, que comprende además la etapa de transportar dichos oocitos en dichas condiciones de fertilización.
19. Un método como se describió en la reivindicación 18, que comprende la etapa de fertilizar al menos algunos de dichos oocitos durante el transporte.

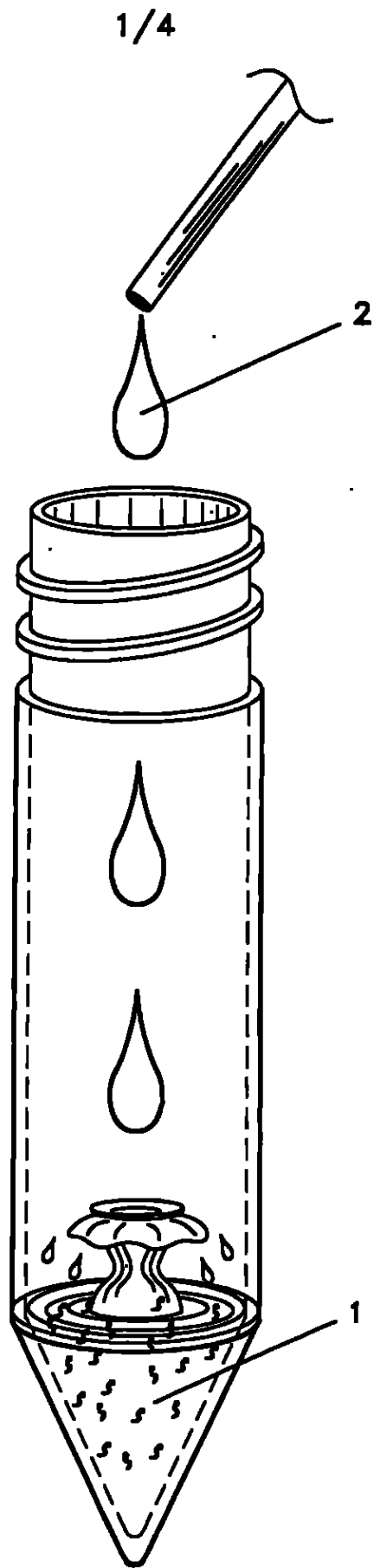


Fig. 1

2/4

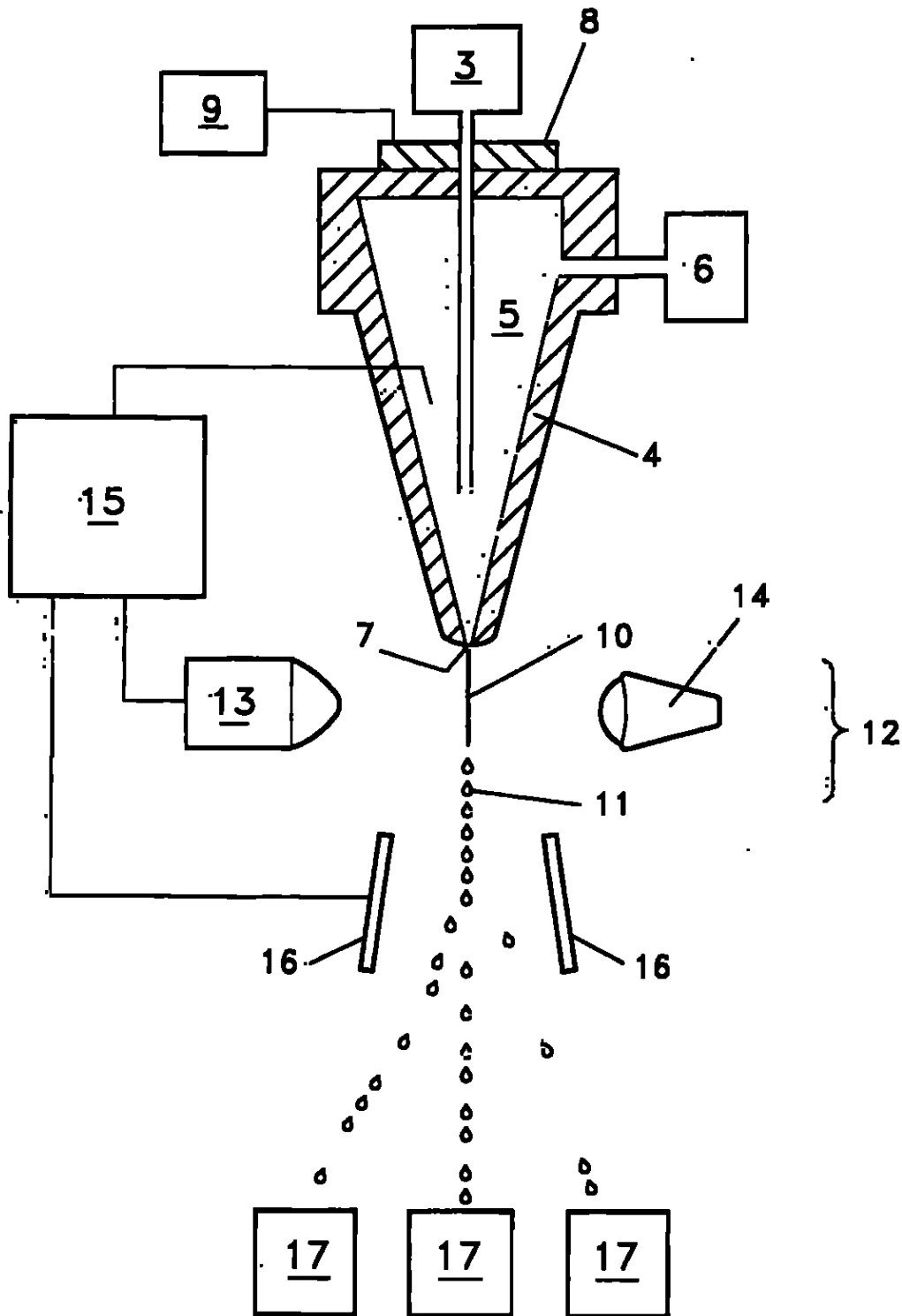


Fig. 2

3/4

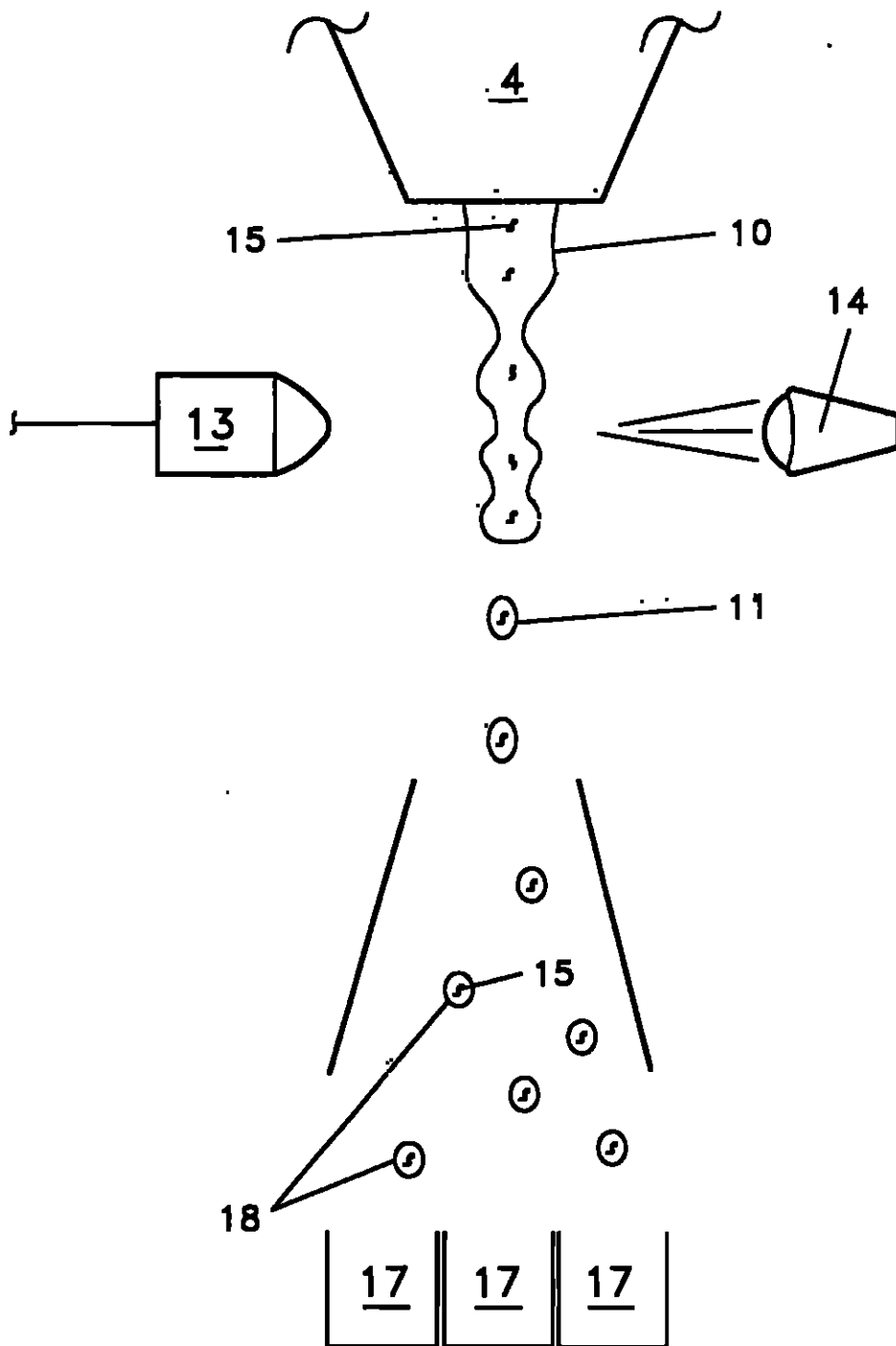


Fig. 3

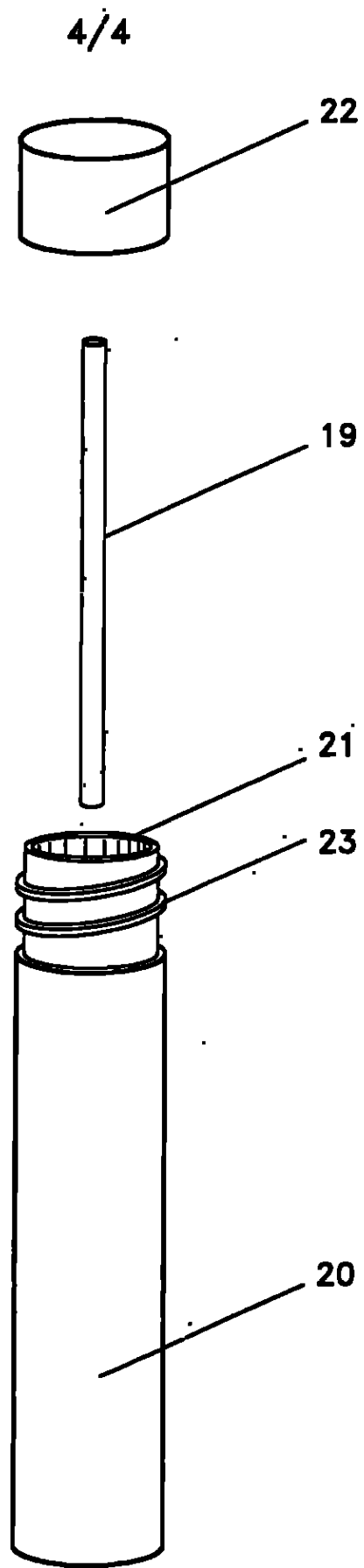


Fig. 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 03-054825- 00005-0000
Pec: 2007-03-09 1/28332 Imp. 2007 NUEVEALFONES
18. 11 PATENTE IYN
Evo: 3/0 TABENAKUNALI
Act 444 RESPUESIAKEUE Fobos: 08

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 14,461
FECHA : FEBRERO 19 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	35767485	19/02/2007	35,641,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-03	CAMBIO DE NOLALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LENAS COMERCIALES	99,000.00
		TOTAL :	\$ 99,000.00

SUN: NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

6060 13577 841 002 1



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

AUTO DC-5610-JC-

218

SOLICITUD PRESTAMO DE DOCUMENTOS

RESPONSABLE Zoraida Hureic Fecha Feb. 23/04

No.	Expediente Número	Edicto Número	Estado	Fecha	No.	Expediente Número	Edicto Número	Estado	Fecha
1	01.33864				6				
2					7				
3					8				
4					9				
5					10				

Firma responsable:

Identificación:

Dirección:

Teléfono:

[Firma]

NOTA: Este expediente es un documento público que no puede ser retirado de la Superintendencia de Industria y Comercio, su incumplimiento acarreará sanciones de ley.

140r560@hotmail.com .

09 FEB 24 AM 4 09

RECIBIDO