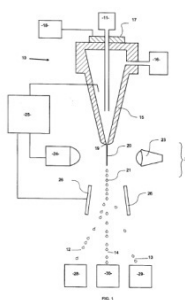


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE - NACIONAL



1	Tipo de solicitud	☒ Patente de invención	☐ Patente de modelo de utilidad
2	Título de la invención	3	CIP Clasificación Internacional de Patentes
COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR LA CALIDAD DEL ESPERMA PROCESADO		Nombre	Código
4	Datos del Solicitante / Titular		
Nombre:	Inguran LLC dba Sexing Technologies	Dirección Electrónica:	patents@brlatina.com
Dirección:	22575 State Highway 6 South Navasota Texas 77868 Navasota, TX USA	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - TEXAS - NAVASOTA
Identificación:			

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

24385793196-

5

Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

1. Inguran LLC dba Sexing Technologies NN 24385793196

6

Datos del Inventor

Nombre:

Richard W Lenz

**Dirección
Electrónica:**

patents@brlatina.com

Dirección:

27253 Geisler Lan P.
O. Box 85 Eastman,
Wisconsin 54626

**Domicilio/País de
constitución:**

ESTADOS UNIDOS DE
AMÉRICA -
WISCONSIN -
WISCONSIN

Identificación:

☐ CEDULA DE
CIUDADANIA
☐ EMPRESA
EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE
EXTRANJERIA
☐ NIT
☒ No Aplica

Número:

-

7

Inventor(es)

Apellidos - Nombres

Domicilio

1. Lenz Richard W ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. Moreno Juan F ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
3. Vishwanath Ramakrishman NUEVA ZELANDA

8

Datos Inventor(es)

	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	WISCONSIN	WISCONSIN	27253 Geisler Lan P. O. Box 85 Eastman, Wisconsin 54626
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	TEXAS	NAVASOTA	22575 State Highway 6 South Navasota, Texas 77868
3.	NUEVA ZELANDA	WAIKATO	HAMILTON	27 The Terrace Te Awa Road, RD3 Hamilton 3283

9	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		ELIANA MARIA REYES FERNANDEZ	Dirección Electrónica:	patents@brlatina.com
Dirección:		Carrera 13 No. 29-41 Oficina 241	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 1032417130-				

Presentación de Poder	
Año de Radicación	2013
Número de Radicación	

10	Declaraciones de prioridad	☒ SI ☐ NO		
	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/492.151	01/06/2011
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/569.143	09/12/2011
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/570.691	14/12/2011

11	Declaración sobre uso de recursos genéticos o biológicos
----	--

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o numero de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 Declaración sobre uso de conocimientos tradicionales

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o numero de registro.

13

Para publicar a partir de la fecha de publicación o de la prioridad invocada

Si es Patente de Invención

☐ 6 Meses ☐ 12 Meses ☐

18 Meses

☒ Otro Cual: 0 Meses

Si es Patente de Modelo de Utilidad

☐ 6 Meses ☐ 12 Meses

☐ Otro Cual:

14

Reivindicaciones

Número reivindicaciones:

37

Pago Reivindicaciones:

Si

15 Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

☐ Micro, pequeñas y medianas empresas

☐ Universidades públicas o privadas

☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

16 Documentos Anexos

☒ Reivindicaciones

☒ Descripción

☒ Dibujos y/o Figuras

☒ Resumen

☐ Certificado Deposito Materia Biologico

☐ Uso de Conocimiento tradicional

☐ Listado de secuencias

☒ Artes finales 12 x 12 cm

☒ Poderes, si fuere el caso

☐ Documento que legalmente pruebe la Cesión del inventor al solicitante o a su causante

☒ Otros anexos



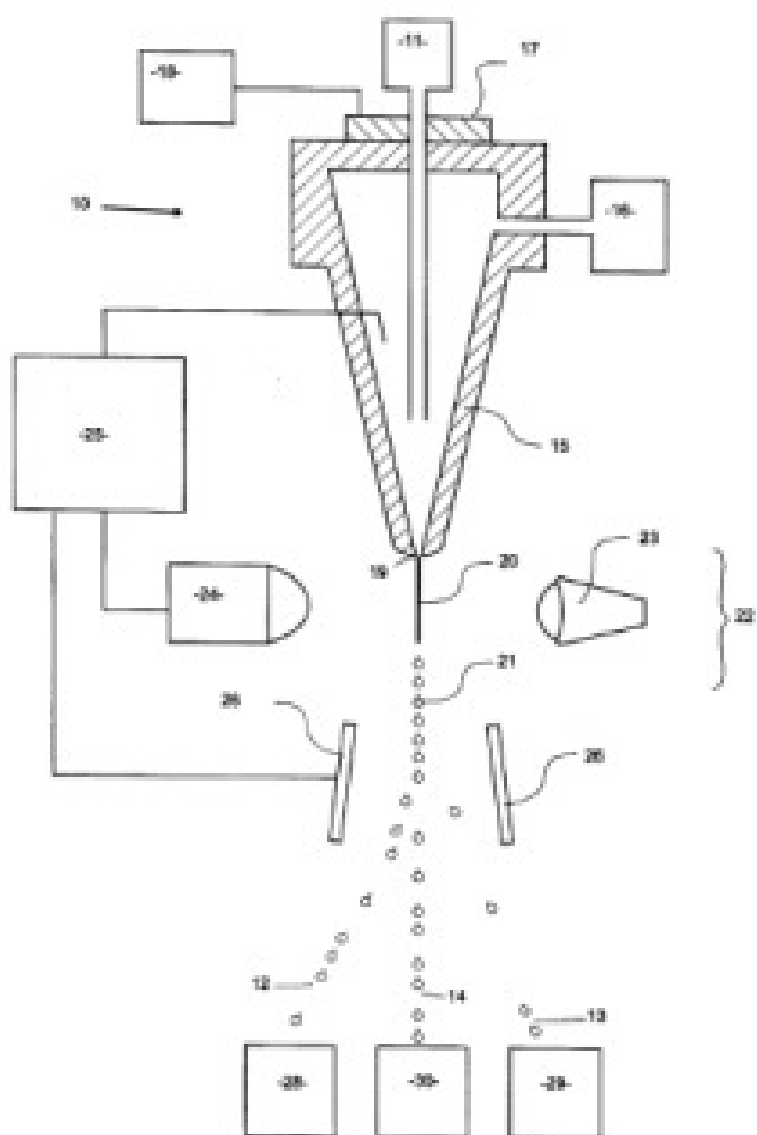


FIG. 1

1/4

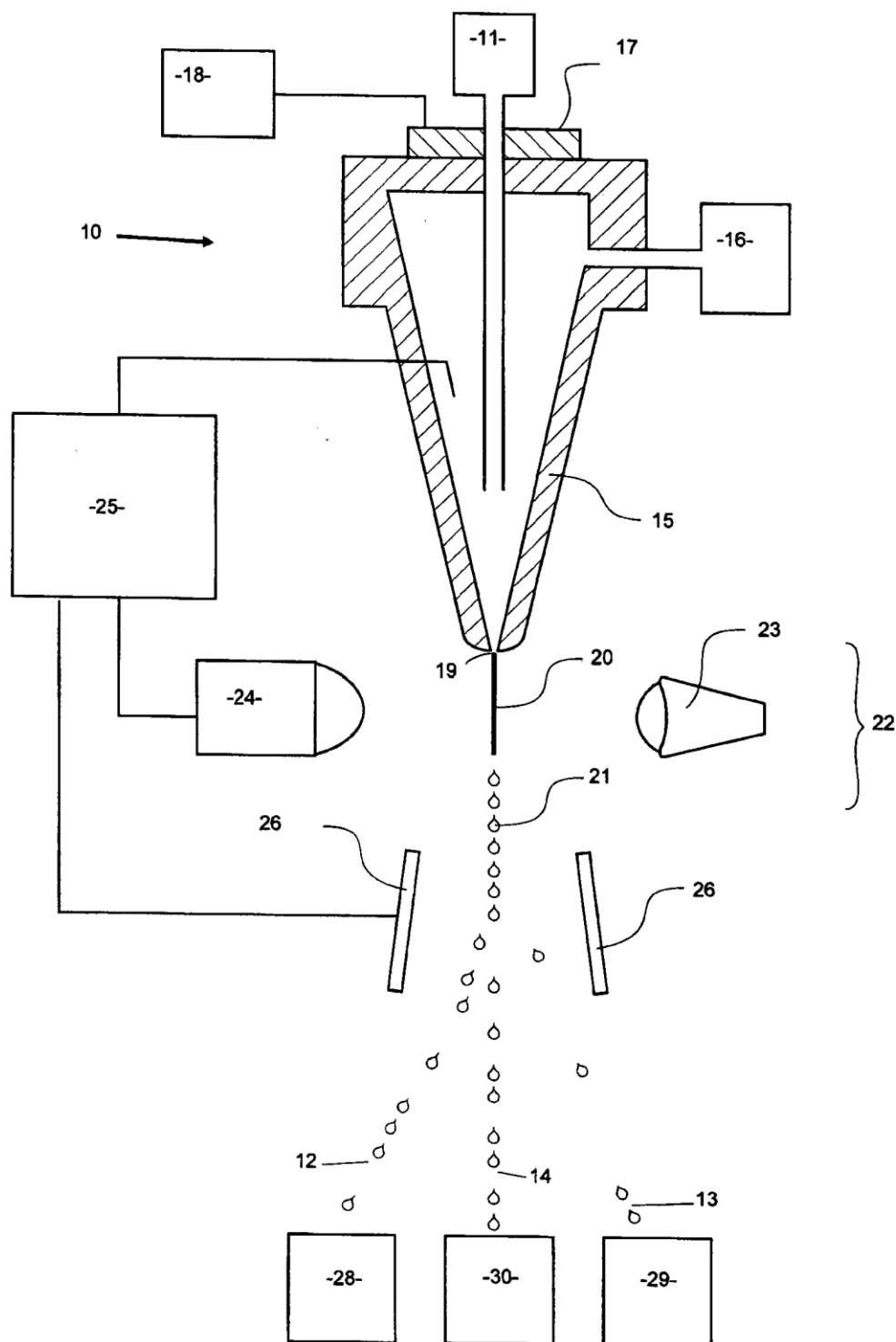


FIG. 1

Figura 2

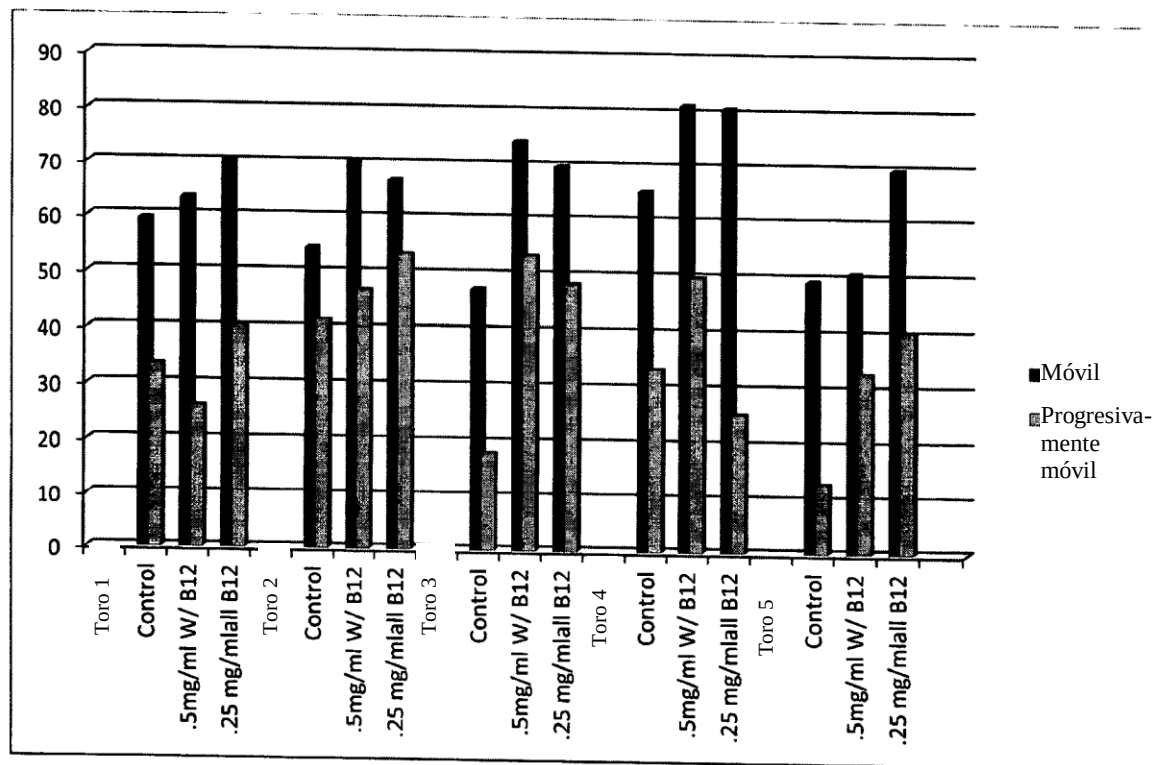
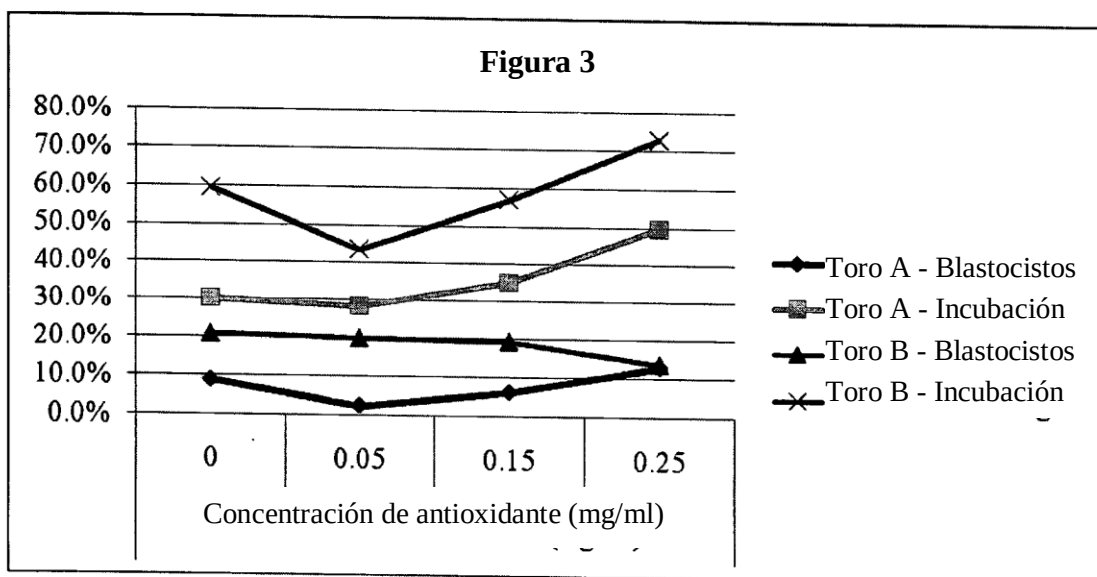
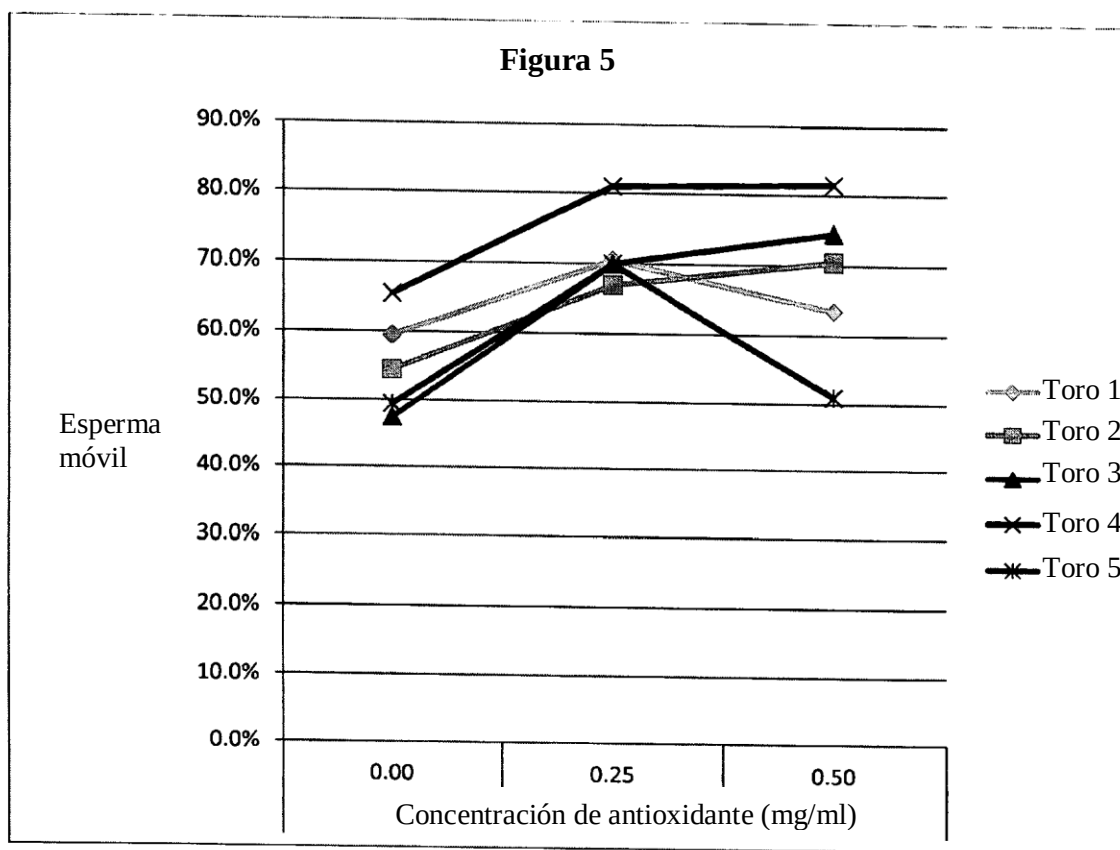
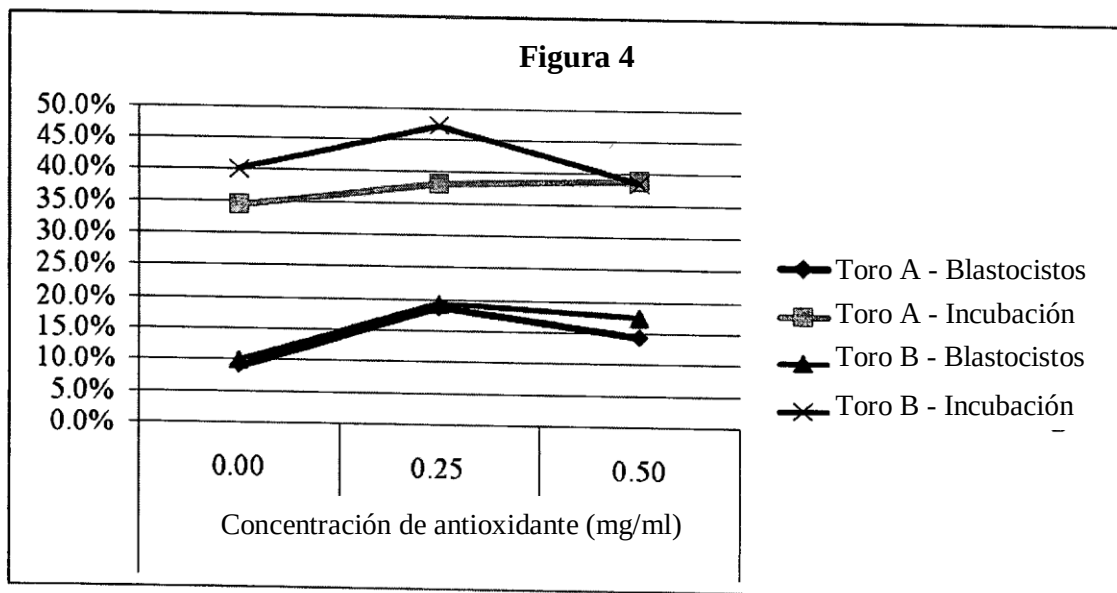
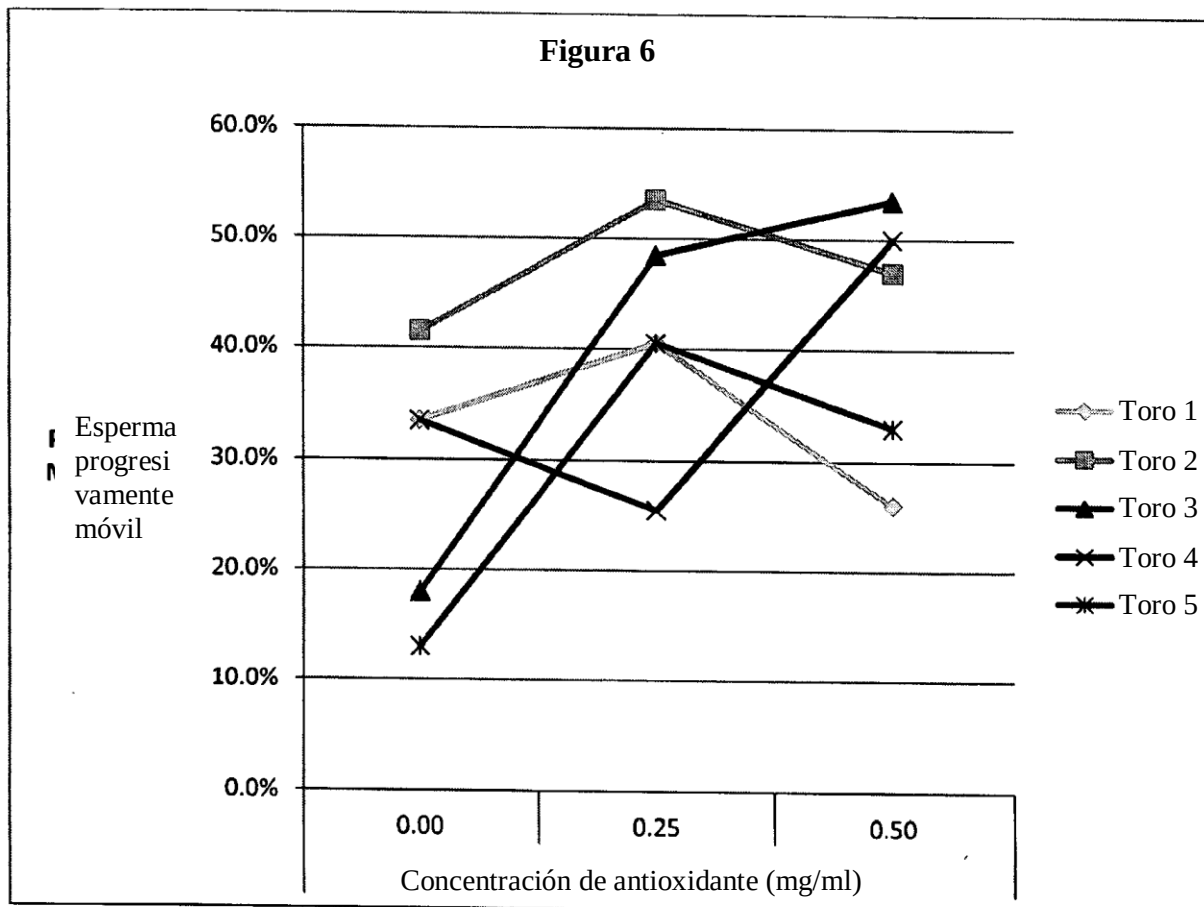


Figura 3







COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR LA CALIDAD DEL ESPERMA
PROCESADO

La presente solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes provisionales de
5 Estados Unidos No. 61/492,151 presentada el 01 de junio de 2011, titulada “Method of
sorting sperm cells into one or more subpopulations and methods of treating sperm cells to
improve motility;” No. 61/569,143 presentada el 09 de diciembre de 2011, titulada
“Methods of handling processed sperm cells to improve their quality;” y No. 61/570,691
presentada el 14 de diciembre de 2011, titulada “Methods of handling processed sperm
10 cells to improve their quality,” cuyo contenido se incorpora en la presente a modo de
referencia en su totalidad.

La presente invención se refiere de forma general a composiciones y métodos para
el manejo de poblaciones de esperma procesado, incluidas las recién extraídas así como las
organizadas en una o más subpoblaciones y para tratar muestras y soluciones de semen
15 procesadas y/o tratadas que contienen células espermáticas para aumentar la calidad global
del esperma procesado, incluida su viabilidad, movilidad, fecundidad, integridad de ADN y
longevidad *in vitro*. La presente invención también se refiere a composiciones que
comprenden células espermáticas y al menos un compuesto que puede ser un antioxidante,
vitamina u otro reductor de tensión orgánico, a métodos para utilizar estos compuestos para
20 reducir el trauma y la tensión sobre el esperma procesado, el esperma resultante y los
productos embrionarios finales y a métodos de uso de estos productos en las tecnologías de

reproducción asistida (ART) para aumentar la calidad, cantidad y viabilidad de los embriones y mejorar las tasas de natalidad en animales.

ANTECEDENTES

La tecnología de reproducción asistida (ART) incluye técnicas como fecundación *in vitro* (IVF), inseminación artificial (AI), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (otras técnicas que utilizan células desnucleadas) y ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) (así como otras técnicas de transferencia de embriones), que se utilizan a lo largo del reino animal incluidos los humanos y otros animales. Los métodos de ART generalmente son costosos, consumen tiempo y son
5
10
15
20
levemente exitosos dada la fragilidad inherente de los gametos y los embriones cuando se encuentran fuera de sus ambientes naturales. Asimismo, el uso de ART en la industria de reproducción animal en una forma comercialmente viable es además complejo debido a la disponibilidad limitada de gametos y cigotos genéticamente deseables. Una forma de reducir el costo de ART y mejorar su viabilidad comercial es aumentar la eficacia de los procesos implicados mediante la mejora de la viabilidad y la calidad global de los gametos y cigotos. A pesar de que ha habido un aumento en el interés por este campo durante el transcurso de la última década, aún existe una fuerte necesidad de aumentar la calidad global de los gametos y cigotos para su uso en ART, especialmente cuando la reproducción se enfoca en la selección prenatal del sexo, incluida la mejora de su viabilidad (en el caso de los gametos y cigotos), su movilidad y fecundidad (en el caso de células espermáticas), así como otras características de longevidad.

Por ejemplo, en la AI convencional, un problema que limita su aplicación comercial en ciertas especies es la necesidad de utilizar un número extremadamente alto de células espermáticas por dosis de AI para asegurar una fecundación exitosa. De forma similar, en IVF, el porcentaje de cigotos que se desarrollan en embriones permanece frustrantemente bajo; esta alta tasa de pérdida aumenta de forma significativa el costo de los embriones y servicios relacionados para usuarios finales. También existe la necesidad de procedimientos más eficientes y menos costosos para mejorar el manejo posterior de los embriones mediante crioconservación así como el transporte no congelado. La crioconservación de embriones se limita por la tasa de éxito de la producción de embriones así como el desarrollo de blastocitos *in vitro*. Actualmente, únicamente un porcentaje mínimo de embriones de IVF son adecuados para la crioconservación lo que se suma al costo elevado de los procedimientos de ART en curso.

Especialmente cuando se procesan gametos como ovocitos o células espermáticas lavadas, ambos convencionales y clasificados por sexo, antes de su uso en ART, se suma una cantidad tremenda de tensión sobre el gameto y se impacta negativamente su integridad celular y estructura de membrana lo que a su vez se ve reflejado en una disminución en la viabilidad, movilidad y fecundidad. Un ejemplo de procesamiento de gametos antes de su uso en ART es la clasificación de células espermáticas según el sexo (conocida como “enriquecimiento de género” o “clasificación por sexo”), que es un procedimiento altamente deseado para minimizar los nacimientos desechados del sexo equivocado para la

reproducción selectiva en la industria de la ganadería pero a menudo puede tener un costo prohibitivo y puede ser riesgoso para aquellos con rebaños de reproducción más pequeños.

El popular proceso de clasificación por sexo basado en citometría de flujo tensiona y daña seriamente las células y produce un porcentaje bajo de espermatozoides útiles, que a pesar de ser capaz de fecundar los ovocitos maduros presentan una viabilidad, movilidad y fecundidad reducida después del proceso de clasificación por sexo. Generalmente, la clasificación por sexo implica muchas etapas duras que incluyen, a modo no taxativo: la recolección y manejo inicial del espermatozoides eyaculado que naturalmente comienza a deteriorarse rápidamente después de la recolección; la tinción de las células espermáticas que implica la unión de un tinte excitante para el ADN o un procedimiento de selección de membrana nocivo; la clasificación física de las células espermáticas mediante el uso de fluorescencia de energía alta que energiza físicamente el tinte que se encuentra unido al ADN, la orientación forzada a través de un orificio angosto y la aplicación de una carga eléctrica a la célula; la recolección física de las células en un recipiente que a menudo golpea la célula frágil tras el contacto; las tensiones osmóticas asociadas con la dilución de la gotita de espermatozoides en el medio de recolección; y el almacenamiento del espermatozoides clasificado generalmente mediante congelamiento, lo que es sabido que ocasiona trastornos en los sistemas de membrana celular. Cada etapa coloca al espermatozoides procesado bajo una tensión anormal que disminuye la movilidad, viabilidad y/o fecundidad global del espermatozoides. El resultado puede conducir a muestras menos eficaces para su uso en ART, como IVF y AI y otros tipos de procesamiento posterior o adicional.

Incluso el esperma procesado sin clasificar muestra pérdidas significativas en la fecundidad, viabilidad y movilidad cuando se recolecta, maneja y transporta sin congelamiento y experimenta de forma perceptible una tensión significativa cuando se mezcla con crioprotectores y se congela y descongela. Muchos en el campo han tratado de
5 mejorar los métodos para el uso de semen convencional sin clasificar para minimizar la pérdida en los procesos de manejo asociada con el manejo *in vitro*, conservación y uso de muestras de semen.

Independientemente del procesamiento, el esperma pierde su capacidad de fecundación cuando se lo expone a: temperaturas elevadas, tampones anormales, tintes,
10 sistemas de pH alterado, orientación física presurizada como cuando se lo forzó a través de una boquilla o cuando se osciló para formar gotas en un citómetro de flujo, radiación utilizada para iluminar el tinte de unión al ADN, tensionantes físicos asociados con las técnicas de separación y recolección, crioprotectores, congelamiento, descongelamiento y micromanipulación por la persona que lo maneja.

15 La gran clase de compuestos denominados como antioxidantes se ha asociado con el suministro de efectos beneficiosos para todos los tipos de células, *in vivo* e *in vitro*, pero estos efectos son tan variados como la naturaleza del antioxidante en sí. El antioxidante es simplemente uno de una gran variedad de moléculas que inhibe la oxidación de otra molécula, se oxida a sí mismo en lugar del sustrato diana o se une a intermedios de
20 radicales libres nocivos e interrumpe las reacciones de las cadenas oxidativas dentro de una célula. La mayoría tiene dos roles; algunos son enzimas, otros no son enzimáticos; otros

son vitaminas y otros son cofactores. Dicha diversidad promueve la diversidad de antioxidantes, pero debido a su capacidad conocida de minimizar el daño celular, frecuentemente se agrupan como una única clase de compuestos que tienen una única función, para unirse a radicales libres.

5 Varios antioxidantes han resultado prometedores para la promoción de la integridad celular con algunos informes que muestran efectos positivos sobre la movilidad del esperma y la integridad de la membrana durante la crioconservación, pero algunas pruebas han mostrado tener efectos mínimos o incluso nocivos sobre el esperma procesado.

10 De forma similar, las vitaminas son nuevamente un grupo algo diverso de moléculas que tienen propiedades biológicas muy diferentes. Las vitaminas son cualquiera de un gran grupo de compuestos orgánicos requeridos en cantidades muy pequeñas como nutrientes vitales para un organismo que no puede sintetizarlo. Pueden ser antioxidantes, enzimas, hormonas o no enzimas; pueden ser reguladores del crecimiento celular, diferenciación celular o moderadores del metabolismo mineral.

15 A la fecha, ningún estudio ha abordado de forma suficiente el uso de antioxidantes, vitaminas u otros complementos en el manejo de rutina de gametos frágiles durante el procesamiento *in vitro*, especialmente durante el procesamiento riguroso asociado con la clasificación por sexo del esperma, por lo cual el resultado final es una mejora reproducible en la viabilidad, movilidad y fecundidad de células espermáticas y embriones procesados
20 de forma exhaustiva. Existe una necesidad continua de mejorar los métodos actuales de ART para reducir el costo y para hacer que los procedimientos sean más confiables y

comercialmente viables para los que disponen de un presupuesto ajustado, especialmente los criadores más pequeños que ven la reproducción de selección de sexo como un riesgo alto y una opción costosa.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 Un objeto amplio de la presente invención es proporcionar mejoras en la movilidad, viabilidad, fecundidad e integridad global de las células espermáticas procesadas. Por consiguiente, una realización de la presente invención comprende un método para tratar células espermáticas mediante la adición de al menos un agente “reductor de tensión orgánico” (OSR) que puede comprender un antioxidante, una vitamina u otra molécula
10 orgánica implicada directamente o indirectamente en la modulación de las tensiones fisiológicas en la célula. El OSR se agregaría en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml a una muestra de célula espermática para formar una composición de células espermáticas. En ciertas realizaciones, uno o más OSR, cada uno en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml, puede agregarse a una muestra de célula
15 espermática antes de la crioconservación (incluido, por ejemplo, el congelamiento y la vitrificación) después que la muestra de célula espermática se descongeló o en ambos momentos. En otras realizaciones, el OSR puede agregarse en una o más de las varias etapas durante el procedimiento de procesamiento de células espermáticas. El término “muestra de célula espermática” puede comprender una muestra de semen procesada o una
20 muestra de semen convencional sin clasificar.

Otra realización específica de la invención comprende la composición de células espermáticas que comprende una muestra de célula espermática y al menos un OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml. Otra realización abarca una “composición de células espermáticas” que comprende una muestra de célula espermática, al menos un OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y un crioprotector. La mayoría de los crioprotectores puede utilizarse con la invención, incluidos, a modo no taxativo, yema de huevo, propilenglicol, dimetil sulfóxido, sacarosa, etilenglicol y glicerol o una combinación de estos. Una realización abarca una composición de células espermáticas recién preparada, sin congelar, congelada, vitrificada o descongelada que comprende una muestra de célula espermática y al menos un OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml. Otra realización abarca una composición de células espermáticas recién preparada, sin congelar, congelada, vitrificada o descongelada que comprende una muestra de célula espermática, al menos un antioxidante y/o una vitamina en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y un tinte.

Otro objeto amplio de la presente invención es mejorar la movilidad, viabilidad (incluida la longevidad y la capacidad de sobrevivir a la tensión ambiental) y/o fecundidad de células espermáticas, donde cada una contribuye a la integridad global de la célula espermática, para mejorar el éxito del uso de ART, incluidas las técnicas como IVF, AI, ICSI (así como otras técnicas que utilizan células desnucleadas) y MOET (así como otras técnicas de transferencia de embriones).

Dichas técnicas de ART implican diferentes niveles de procesamiento de gametos que en el caso del espermatozoide puede suponer, como ejemplo únicamente y a modo no taxativo, una o más de las siguientes: recolección artificial de una muestra de semen del animal macho que puede implicar estimulación sexual natural, electrónica u otros tipos de
5 estimulación sexual; mantenimiento; transporte; tamponación con diferentes pH; enfriamiento; calentamiento; tinción; dilución; concentración; excitación energética con láser; carga electrónica; deflexión; ablación para matar las células indeseadas generalmente con láser dirigido; clasificación; recolección; agitación; oscilación; separación magnética; oxigenación asociada con procedimientos de clasificación por microchip; marcación;
10 precipitación; centrifugación; resuspensión; mezcla; diálisis; crioestabilización; congelamiento; vitrificación; descongelamiento; cultivo; inseminación; microinyección; procesamiento microfluídico; procesamiento con microchip; procesamiento a chorro y con aire; procesamiento de citometría de flujo; y técnicas de manejo similares. Mientras que una única etapa de procesamiento puede ejercer solamente tensiones mínimas sobre la
15 célula espermática, otras o una combinación puede agregar tensión significativa, lo que a menudo mata la célula. Un ejemplo extremo es un proceso de clasificación por sexo utilizado para separar las células que presentan el cromosoma X de las que presentan el cromosoma Y; el proceso de clasificación combina una gran cantidad de etapas altamente tensionantes que comprometen seriamente la integridad global de la población de células
20 espermáticas clasificadas.

Por consiguiente, una realización de la presente invención radica ampliamente en el uso de una composición de células espermáticas, que comprende una muestra de célula espermática y al menos un antioxidante y/o al menos una vitamina en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml, en ART. Una realización específica de la invención comprende un método para aumentar el porcentaje de cigotos que se desarrollan en embriones en una muestra dada en un tiempo dado, así como aumentar el porcentaje de embriones que son adecuados para la crioconservación (es decir, el porcentaje de embriones que son blastocistos, blastocistos expandidos o incubados o blastocistos incubados) mediante la mezcla de un huevo con una muestra de célula espermática que se trató con al menos un OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml. Otra realización de la invención radica en un método para preparar un embrión que comprende mezclar al menos un huevo con una muestra de células espermáticas tratadas con al menos un OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml. Los embriones producidos mediante este método constituyen una realización adicional de la invención. Otra realización incluye un método para inseminar un organismo a través de la técnica de AI mediante el uso de una muestra de célula espermática tratada con al menos un OSR en una concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml. Otra realización incluye un método para transferir un embrión a una hembra receptiva (ET) donde dicho embrión se prepara mediante el uso de una muestra de célula espermática tratada con al menos un OSR en una concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml. La progenie del organismo que resulta del método de AI mencionado anteriormente también constituye una realización de la invención.

La mayoría de las realizaciones de la invención utilizan concentraciones de OSR que se seleccionan de los siguientes intervalos: de 0.01 a 5.0 mg/ml; de 0.01 a 0.25 mg/ml; de 0.01 a 0.5 mg/ml; de 0.01 a 1 mg/ml; de 0.01 a 2.5 mg/ml; de 0.01 a 5 mg/ml; de 0.05 a 0.1 mg/ml; de 0.05 a 1.0 mg/ml; de 0.05 a 2.5 mg/ml; de 0.1 a 0.25 mg/ml; de 0.1 a 0.5 mg/ml; de 0.1 a 1 mg/ml; de 0.1 a 2.5 mg/ml; de 0.1 a 5 mg/ml; de 0.15 a 0.45 mg/ml; de 0.15 a 0.5 mg/ml; de 0.25 a 0.35 mg/ml; de 0.25 a 0.5 mg/ml; de 0.25 a 1 mg/ml; de 0.25 a 2.5 mg/ml; de 0.25 a 5 mg/ml; de 0.35 a 0.5 mg/ml; de 0.35 a 1 mg/ml; de 0.35 a 2.5 mg/ml; de 0.35 a 5 mg/ml; de 0.5 a 1 mg/ml; de 0.5 a 2.5 mg/ml; de 0.5 a 5 mg/ml; de 1 a 2.5 mg/ml; de 1 a 5 mg/ml; aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición de células espermáticas puede utilizarse inmediatamente o procesarse a los pocos minutos de la adición del OSR para cualquier etapa de procesamiento que sea necesaria, por lo que el período de espera se encontraría en el intervalo de 2 segundos a 3 minutos. En otras realizaciones, la composición de células espermáticas se mantiene después de la adición de los OSR para permitir que los OSR se incorporen en las células y produzcan efectos protectores sobre la población de células. Dichos períodos de espera pueden ser breves, como en el intervalo de 3 a 15 minutos, moderados como en el intervalo de 15 minutos a 1 hora y períodos de procesamiento más prolongados que varían de hasta aproximadamente 8 horas o durante la noche para un procesamiento exhaustivo como con técnicas de clasificación por sexo. Los

períodos de espera de transporte asociados con el transporte de composiciones de células espermáticas sin congelar puede ser mucho más prolongado, extendiéndose hasta unos pocos días, lo que puede ocurrir, por ejemplo, si la muestra se recolecta, trata con la adición de uno o más OSR, transporta o envía a otra ubicación posiblemente por aire y procesarse

5 de forma adicional en la segunda ubicación como para la clasificación por sexo en una instalación designada. En otros casos, puede que sea necesario retener la composición de células espermáticas durante algunos días mientras que la hembra receptora se prepara hormonalmente para la inseminación artificial, como puede ocurrir si una muestra se descongela por error y no se puede volver a congelar. La adición de los OSR puede

10 prolongar teóricamente estos períodos de espera prolongados más allá de lo que se acepta actualmente en la técnica y puede proporcionar protección suficiente al esperma en la composición de células espermáticas de forma tal que puedan permanecer viables y fértiles durante hasta una semana o más.

En algunas realizaciones de la invención, el OSR se agrega varias veces durante un

15 procedimiento de procesamiento complejo para minimizar la tensión celular a lo largo del procedimiento. En otras realizaciones, el OSR se agrega a las células únicamente en una o más etapas particulares que son notablemente rigurosas para las células, para ayudar a minimizar la tensión y fatiga sobre las células espermáticas. A modo de ejemplo, el proceso de tinción durante la clasificación por sexo habitualmente se lleva a cabo a un pH

20 no fisiológico y a temperaturas elevadas, ambos conocidos por ser rigurosos para las células. De forma similar, la crioconservación también es extremadamente rigurosa para las

células y altera las membranas celulares internas y externas. Después de un procedimiento de clasificación intensivo de múltiples etapas, las células espermáticas clasificadas por sexo que ya se encuentran comprometidas son aún más susceptibles al procesamiento criogénico y por congelamiento.

5 Varios OSR pueden utilizarse en el contexto de la presente invención, incluidos a modo no taxativo: catalasa, superóxido dismutasa (SOD), miméticos de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, hidroxitolueno butilado (BHT), ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12 (y vitámeros relacionados), donde ‘vitámeros’ se definen como compuestos que
10 presentan la misma actividad vitamínica (como cobalamina, cianocobalamina, metilcobalamina, adenosilcobalamina, hidroxocobalamina y pseudo-B12), vitamina E (incluidos sus vitámeros, tocoferoles (α , β , γ), tocotrienoles y α -tocoferilo), alfa-cetoglutarato (también conocido como α -KG, AKG u oxo-glutarato) y varias formas biológicas de AKG (como arginina, aspartato, lisina y derivados similares), otros
15 compuestos que regulan el óxido nítrico en la célula incluido el malondialdehído (MDA) y la dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

Una realización adicional de la invención comprende un método para clasificar una muestra de célula espermática para formar una o más subpoblaciones que comprende las etapas de proporcionar una muestra de célula espermática, clasificar la muestra de célula
20 espermática para formar una o más subpoblaciones y agregar al menos un OSR a la muestra de célula espermática durante una o más de las etapas de clasificación mencionadas

anteriormente, donde la concentración de OSR se encuentra en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml.

Una realización adicional de la invención abarca un medio utilizado en el procesamiento de células espermáticas que comprende al menos un OSR en una
5 concentración adecuada de solución madre presente en una concentración de procesamiento final en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml en la composición de células espermáticas al momento del procesamiento. Puede utilizarse un medio de reducción de tensión para diferentes procesos que incluyen a modo no taxativo, recolección de esperma, inseminación artificial, clasificación de esperma, fecundación *in vitro*, cultivo de embriones así como
10 congelamiento de esperma y embriones. Los medios utilizados en la clasificación de las células espermáticas generalmente comprenden uno o más tampones y/o diluyentes (es decir, sustancias que conservan la viabilidad y/o fecundidad de las células espermáticas).

Puede utilizarse cualquier tampón o solución tamponada en el procesamiento del esperma en el medio mencionado anteriormente, que incluye a modo no taxativo, fosfatos,
15 citratos, acetatos, lactatos y sus combinaciones o una solución que contiene una sal, un carbohidrato o sus combinaciones en algunas de las realizaciones de la invención como, a modo no taxativo: Tris, TES, HEPES, TALP, TCA, PBS, citrato, leche y sus derivados, como se discute en detalle en la patente de Estados Unidos No. 7,208,265, cuyo contenido se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad.

20 Puede utilizarse cualquier diluyente en el procesamiento de esperma en el medio mencionado anteriormente, que incluye, a modo no taxativo, fuentes de energía, fuentes de

proteínas y antibióticos y puede incluir uno o más de los siguientes: mono y disacáridos, como fructosa, glucosa, manosa, sacarosa y lactosa; fuentes de proteínas, como yema de huevo, leche, BSA y sus derivados; y cualquiera de los agentes antimicrobianos o antibióticos comúnmente conocidos, como gentamicina, lincomicina, espectinomicina, sus
5 derivados o cualquiera de sus combinaciones.

Como se utiliza en la presente, el término “diluyente” también puede incluir ciertas sustancias orgánicas como disacáridos, trisacáridos y cualquiera de sus combinaciones, yema de huevo, leche, albúmina, lecitina, colesterol, sus derivados y cualquiera de sus combinaciones. El diluyente también puede incluir un detergente que puede ser un
10 detergente de alquilo iónico como dodecil sulfato de sodio (SDS).

Una realización adicional de la presente invención proporciona un método para mejorar la movilidad, viabilidad y/o fecundidad de una muestra de célula espermática que ya experimentó un proceso de clasificación, incluida a modo no taxativo la clasificación por sexo, que comprende la etapa de agregar al menos un OSR en un intervalo de concentración
15 de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml a una muestra de célula espermática clasificada para formar una composición de células espermáticas.

Por consiguiente, la presente invención radica ampliamente en el uso de una composición de células espermáticas, que en algunas realizaciones comprende una muestra de célula espermática clasificada y al menos un OSR en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5
20 mg/ml para su uso en ART. Otra realización abarca una composición de células espermáticas que comprende células espermáticas clasificadas, al menos un OSR en un

intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y un medio de recepción (es decir, un medio encontrado en el recipiente que recibe o atrapa el esperma clasificado al final del proceso de clasificación). Otra realización abarca una composición de células espermáticas que comprende una muestra de célula espermática procesada o clasificada, un OSR en un
5 intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y un crioprotector. Una realización adicional de la invención comprende una composición de células espermáticas vitrificada que comprende una muestra de célula espermática procesada o clasificada y al menos un OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml.

Otro objeto amplio de la presente invención es mejorar la movilidad, viabilidad
10 (incluida la longevidad y la capacidad de sobrevivir a la tensión ambiental) y fecundidad de las células espermáticas procesadas y/o clasificadas para su uso en ART como IVF, AI, ICSI (así como otras técnicas que utilizan células desnucleadas) y MOET (así como otras técnicas de transferencia de embriones).

Por consiguiente, algunas de las realizaciones de la presente invención incorporan el
15 uso de células espermáticas clasificadas por sexo que presentan un OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml en ellas en ART.

Por consiguiente, otras realizaciones de la presente invención incorporan el uso de una composición de células espermáticas, una muestra de célula espermática clasificada y al menos un OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml en ART.

20 Una realización específica de la invención comprende un método para aumentar el porcentaje de cigotos que se desarrollan en embriones en una muestra dada en un tiempo

dado, así como aumentar el porcentaje de embriones que son adecuados para la crioconservación (es decir, el porcentaje de embriones que son blastocistos, blastocistos expandidos e incubados y blastocistos incubados) mediante la mezcla de un huevo con una muestra de célula espermática clasificada que se trató con al menos un OSR en un intervalo
5 de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml.

Otra realización de la invención radica en un método para preparar un embrión que comprende mezclar al menos un huevo con al menos una muestra de células espermáticas tratadas con al menos un OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml. Los embriones producidos mediante este método constituyen una realización adicional de
10 la invención.

Otras realizaciones de la invención incluyen además un método para inseminar un organismo a través de una técnica de AI mediante el uso de una muestra de célula espermática procesada o clasificada tratada con al menos un OSR en una concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml. La progenie del organismo que resulta del método de AI
15 mencionado anteriormente también constituye una realización de la invención. Asimismo, una realización de la invención comprende un método para recuperar embriones que se producen con el método de AI mencionado anteriormente.

Las realizaciones de la invención pueden incluir células espermáticas o espermatozoides, recolectados de varias especies de mamíferos macho y debe entenderse
20 que la invención no se limita a las especies de mamíferos descritas por los ejemplos específicos dentro de esta solicitud. En su lugar, los ejemplos específicos en esta solicitud

pretenden ilustrar las variadas y numerosas especies de mamíferos macho a partir de los cuales puede recolectarse semen y utilizarse en ciertas realizaciones de la invención. Las realizaciones de la invención, por ejemplo, pueden incluir células espermáticas de humanos así como animales que tienen un valor comercial para la producción de carne o productos lácteos como porcinos, ovinos, bovinos, equinos, ciervos, alces, búfalos o similares (naturalmente los mamíferos utilizados para la producción de carne y productos lácteos pueden variar de cultura a cultura). También puede incluir las células espermáticas de varias especies de mamíferos domesticados que incluyen caninas y felinas, así como células espermáticas de primates, incluidos a modo no taxativo, chimpancés, gorilas o humanos y espermatozoides de ballenas, delfines y otros mamíferos marinos. También puede incluir células espermáticas congeladas-descongeladas de todos los varios mamíferos descritos anteriormente y que también incluyen, a modo no taxativo, las células espermáticas de donantes fallecidos, de mamíferos raros o exóticos, ejemplares de zoológico o especies en peligro de extinción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para que la invención se comprenda más claramente, las realizaciones preferidas de la presente invención se describirán a modo de ejemplo únicamente con referencia a las hojas de dibujos adjuntas donde:

La figura 1 es una representación esquemática de parte de un citómetro de flujo que ilustra un método para clasificar una muestra de célula espermática en una o más subpoblaciones de conformidad con algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 2 ilustra una representación gráfica de la movilidad y movilidad progresiva encontrada en la tabla 1.

La figura 3 es una representación gráfica del porcentaje de blastocistos y el porcentaje de incubación encontrado en la tabla 4.

5 La figura 4 es una representación gráfica del porcentaje de blastocistos y el porcentaje de incubación encontrado en la tabla 5.

La figura 5 es una representación gráfica del porcentaje de espermia móvil encontrado en la tabla 1.

La figura 6 es una representación gráfica del porcentaje de espermia progresivamente
10 móvil encontrado en la tabla 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto de la presente invención, la figura 1 ilustra en forma esquemática parte de un citómetro de flujo utilizado en un método para clasificar una muestra de célula espermática para formar una o más subpoblaciones, generalmente se hace referencia al
15 citómetro de flujo como 10. En esta realización particular la clasificación por sexo se lleva a cabo de forma tal que las subpoblaciones son células espermáticas que presentan el cromosoma X y células espermáticas que presentan el cromosoma Y. La figura 1 representa una única técnica para clasificar el semen, pero puede utilizarse cualquier técnica conocida en la técnica para clasificar células con ciertas realizaciones de la
20 invención. Detalles adicionales del aparato y metodología básica para clasificar el espermia

se describen en las patentes de Estados Unidos 5,135,759 y 7,371,517, cuyo contenido se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad.

Una vez que la célula espermática se recolectó puede diluirse con un diluyente inmediatamente después de la recolección que incluye uno o más antioxidantes o vitaminas.

5 La muestra a continuación se mantiene generalmente a una temperatura de aproximadamente 5°C durante 12 a aproximadamente 18 horas mientras que se envía desde el punto de recolección hasta el citómetro de flujo 10 para el proceso de clasificación. Esta temperatura de mantenimiento puede encontrarse en el intervalo entre 4°C y 39°C y comúnmente se encuentra en el intervalo de 4°C y 16°C.

10 Tras el ingreso en el citómetro de flujo, la muestra se tiñe con tinte selectivo para el ADN y un tinte de inactivación para formar una muestra de célula espermática teñida y posteriormente se coloca en una fuente de célula espermática 11 del citómetro de flujo 10. El citómetro de flujo 10 puede programarse por un operador para generar dos corrientes de gotas cargadas, una que contiene células espermáticas que presentan el cromosoma X, con
15 carga positiva 12, una que contiene células espermáticas que presentan el cromosoma Y, con carga negativa 13 mientras que una corriente inalterada sin carga de células muertas 14 simplemente se desperdicia.

El operador también puede escoger programar el citómetro de flujo de forma tal que se recolecte el esperma que presenta el cromosoma X e Y mediante el uso de una
20 “clasificación de alta pureza” (en otras palabras, se recolecta únicamente el esperma vivo que presente el cromosoma X e Y) o programar el citómetro de flujo para recolectar el

esperma que presenta el cromosoma X e Y mediante el uso de una “clasificación enriquecida” (en otras palabras, se recolectarán las gotitas que contienen esperma vivo que no se clasificó previamente y excluido todo el esperma muerto inicial nuevamente mediante el uso de un dispositivo de lógica booleana disponible en la computadora que controla el

5 citómetro de flujo). El dispositivo de lógica booleana también puede utilizarse para recolectar únicamente el esperma que presente el cromosoma X o el que presenta el cromosoma Y.

Inicialmente, la corriente de células espermáticas bajo presión, se deposita en la boquilla 15 de la fuente de células espermáticas 11 de forma tal que puedan rodearse

10 coaxialmente por un líquido de revestimiento colocado en la boquilla 15 bajo presión a partir de una fuente de líquido 16. Un oscilador 17, que puede encontrarse presente, puede controlarse de forma muy precisa mediante un mecanismo de control de oscilador 18, que crea ondas de presión dentro de la boquilla 15 que se transmiten a la corriente de células espermáticas rodeada coaxialmente a medida que abandona el orificio de la boquilla 19.

15 Como resultado, la corriente saliente de células espermáticas rodeada coaxialmente 20 puede finalmente y de forma regular formar gotitas 21.

La carga de las corrientes de gotitas respectivas es posible gracias al sistema de detección de células 22 que incluye un láser 23 que ilumina la corriente que sale de la boquilla 20 y la emisión de luz de la corriente fluorescente se detecta por un sensor 24. La

20 información recibida por el sensor 24 se ingresa en un sistema de clasificación 25 que rápidamente toma la decisión de cargar o no una gotita en formación y en caso afirmativo

qué carga se le proporcionará a la gota en formación y después carga la gotita 21 en consecuencia.

Una característica del esperma que presenta el cromosoma X es que tiende a absorber más tinte de fluorocromo que el esperma que presenta el cromosoma Y y como tal, la cantidad de luz emitida por el tinte absorbido excitado con láser en el esperma que presenta el cromosoma X difiere de la del esperma que presenta el cromosoma Y y esta diferencia en dicha característica le dice al sistema de clasificación 25 qué carga se le debe aplicar a las gotitas que contienen células espermáticas que presentan únicamente el cromosoma X o únicamente el cromosoma Y. Las células muertas (o aquellas a punto de morir) absorbieron el tinte de inactivación y el sistema de clasificación 25 no carga las gotitas que contienen dichas células.

Las corrientes de gotitas cargadas o sin carga a continuación pasan entre un par de placas cargadas electrostáticamente 26, que hacen que se desvíen hacia un lado o hacia el otro o que no se desvíen en función de su carga hacia los respectivos recipientes de recolección 28 y 29 para formar respectivamente una población enriquecida por sexo de células espermáticas que presentan el cromosoma X y una población enriquecida por sexo de células espermáticas que presentan el cromosoma Y que tienen tinte selectivo para el ADN asociado con su ADN. La corriente inalterada sin carga que contiene una subpoblación de células muertas (o que están a punto de morir) va al recipiente de desperdicios 30.

Las células espermáticas clasificadas por sexo recolectadas a continuación pueden congelarse y almacenarse o congelarse y enviarse para el procesamiento adicional (o simplemente utilizarse inmediatamente para el procesamiento adicional), donde procesamiento adicional significa, por ejemplo, a efectos de investigación o para su uso en

5 ART como IVF, AI, ICSI (así como otras técnicas que utilizan células desnucleadas) y MOET (así como otras técnicas de transferencia de embriones).

En realizaciones alternativas no ilustradas, el medio de recepción contenido en los recipientes que de otro modo estarían vacíos también pueden contener OSR en un intervalo de concentración de 0.01mg/ml a 5mg/ml. El OSR puede agregarse durante esta etapa del

10 proceso de clasificación (sea clasificación por sexo u otro tipo de clasificación) y/o además de otra etapa del método en el proceso de clasificación (sea clasificación por sexo u otra forma de clasificación).

Asimismo, en realizaciones alternativas, el OSR administrado en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml a la muestra o composición de células espermáticas

15 puede agregarse al tinte selectivo para el ADN y/o a las soluciones de tinte de inactivación. Algunas realizaciones incluyen el uso de uno o más OSR como componentes premezclados de los tampones, diluyentes, tintes, líquidos de recepción y/o criodiluyentes preparados utilizados en el procedimiento de clasificación por sexo. Por consiguiente, el OSR puede agregarse a la muestra de célula espermática en una o más etapas durante la clasificación

20 por sexo, incluso cuando la muestra de célula espermática se maneja por primera vez después de la recolección y/o se tiñe con un tinte selectivo para el ADN y/o un tinte de

inactivación y/o en el momento de la recolección del citómetro de flujo y/o después cuando la muestra se prepara para la crioconservación mediante la adición de OSR o cóctel de OSR al criodiluyente.

Del mismo modo, algunas realizaciones de clasificación incluyen la clasificación
5 del semen convencional congelado-descongelado por la cual el OSR puede agregarse a la muestra de semen descongelada poco después del descongelamiento y clasificarse de forma inversa para producir subpoblaciones de células espermáticas clasificadas por sexo que incluyen la adición de un OSR en una o más etapas durante el procedimiento de procesamiento prolongado de selección de sexo.

10 En algunos casos, cuando la clasificación de las células espermáticas no implicará clasificación por sexo, puede que sea necesario un tinte de inactivación sin la necesidad de tinte que tiña el ADN, en cuyo caso el OSR únicamente se encontrará presente en el tinte de inactivación para formar la muestra teñida. De esta forma, en función de la realización escogida, nuevamente el OSR puede agregarse únicamente durante esta etapa de proceso de
15 clasificación (sea clasificación por sexo u otro tipo de clasificación) o además de al menos otra etapa del método en el proceso de clasificación (sea clasificación por sexo u otra forma de clasificación).

Nuevamente, en las realizaciones alternativas, las células espermáticas clasificadas por sexo recolectadas (o en realizaciones alternativas, las muestras de célula espermática
20 clasificadas, esto es, no clasificadas por sexo) una vez congeladas requerirán, antes de dicho procesamiento adicional, su descongelamiento. Antes del congelamiento o después

del descongelamiento, el antioxidante, nuevamente en un intervalo de concentración de 0.01mg/ml a 5mg/ml, puede agregarse a la muestra antes del congelamiento y/o a la muestra descongelada. De esta forma, en función de la realización escogida, nuevamente el OSR puede agregarse únicamente durante esta etapa de proceso de clasificación (sea
5 clasificación por sexo u otro tipo de clasificación) o además de al menos otra etapa del método en el proceso de clasificación (sea clasificación por sexo u otra forma de clasificación).

En otras realizaciones alternativas, el transcurso de tiempo permitido después de la adición del OSR, puede variar y puede encontrarse en un intervalo de aproximadamente 5
10 segundos a aproximadamente 72 horas (excluido el tiempo de congelamiento y el tiempo en el congelador o en el estado crioconservado), donde el extremo inferior de la escala proporciona una clasificación casi inmediata de la muestra de esperma mientras que el extremo superior de la escala cubriría el marco de tiempo máximo típico asociado con el movimiento de la muestra de esperma desde su punto de recolección hasta su punto de
15 clasificación. Este generalmente es el tiempo de vuelo y/o de transporte terrestre. Más particularmente, los períodos de tiempo pueden ser de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 3 horas; de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 6 horas; de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas; de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 18 horas; de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 24 horas; de
20 aproximadamente 24 horas a aproximadamente 36 horas; de aproximadamente 36 horas a

aproximadamente 48 horas; de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 60 horas; y de aproximadamente 60 horas a aproximadamente 72 horas.

Otra realización alternativa puede incluir el uso de un diluyente dentro de un intervalo de pH de 5.5 a 7.8 y frecuentemente a un pH de aproximadamente 6.5; aproximadamente 6.6; aproximadamente 6.7; aproximadamente 6.8; aproximadamente 6.9; 5 aproximadamente 7.0; aproximadamente 7.1; aproximadamente 7.2; aproximadamente 7.3; aproximadamente 7.4 o aproximadamente 7.5.

Como se describe en la realización ilustrada, se llevan a cabo diferentes etapas del método a diferentes temperaturas. En realizaciones alternativas, al menos una de las etapas 10 del método se lleva a cabo dentro de un intervalo de temperatura que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 5°C a aproximadamente 15°C; aproximadamente 15°C a aproximadamente 20°C; aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C; aproximadamente 25°C a aproximadamente 30°C; aproximadamente 30°C a aproximadamente 35°C; aproximadamente 35°C a aproximadamente 40°C y 15 aproximadamente 40°C a aproximadamente 45°C. Esto permite que las diferentes etapas en el método de clasificación se realicen en diferentes intervalos de temperatura.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar la movilidad de las células espermáticas en una muestra de célula espermática. En esta realización, la muestra de célula espermática, que puede ser una población enriquecida por 20 sexo de células espermáticas que presentan el cromosoma X o que presentan el cromosoma Y que tienen tinte selectivo para el ADN o tinte de unión al ADN asociado con su ADN,

una muestra clasificada en una o más subpoblaciones o una muestra convencional sin clasificar, el método para tratar la movilidad de las células espermáticas en la muestra de célula espermática comprende la etapa de agregar un OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5mg/ml a la muestra de célula espermática para formar una composición de células espermáticas (y en esta realización a una concentración de 0.5 mg/ml). El OSR que se agrega forma parte de un diluyente que se encuentra en un intervalo de pH de 6.5 a 7.5 y en realizaciones particulares, el pH se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 6.5; aproximadamente 6.6; aproximadamente 6.7; aproximadamente 6.8; aproximadamente 6.9; aproximadamente 7.0; aproximadamente 7.1; aproximadamente 7.2; aproximadamente 7.3; aproximadamente 7.4 y aproximadamente 7.5.

Después de la adición del antioxidante, se permite el transcurso de un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 72 horas antes de que la muestra experimente procesamiento adicional en la forma de por ejemplo, investigación o para su uso en tecnologías de reproducción asistida como IVF, AI, ICSI (así como otras técnicas que utilizan células desnucleadas) y MOET (así como otras técnicas de transferencia de embriones). El transcurso de tiempo permitido puede seleccionarse del intervalo que consiste en: aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 3 horas; de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 6 horas; de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas; de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 18 horas; de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 24 horas; de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 36 horas; de aproximadamente 36 horas a aproximadamente 48 horas; de

aproximadamente 48 horas a aproximadamente 60 horas y de aproximadamente 60 horas a aproximadamente 72 horas. Las técnicas para fecundar un huevo implican la etapa adicional de mezclar al menos un huevo con la muestra de célula espermática. Puede utilizarse con la invención cualquier técnica convencional como las listadas anteriormente
5 incluida cualquier técnica de IVF o AI convencional. Las técnicas de IVF típicas se divulgan en WO/0243486, por ejemplo, que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. Las técnicas de AI típicas se divulgan en la patente de Estados Unidos No. 6,149,867, por ejemplo, que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad.

10 En realizaciones alternativas, la muestra de célula espermática puede haber sido una muestra congelada que se dejó descongelar. El método puede comprender además la etapa de teñir la muestra de célula espermática o la composición de células espermáticas con tinte selectivo para el ADN si la muestra no es una muestra clasificada por sexo.

El método puede comprender además la etapa de congelar la composición de células
15 espermáticas para formar una composición de células espermáticas congelada que puede dejarse descongelar. Al menos una de las etapas del método en este segundo aspecto de la presente invención se lleva a cabo dentro de un intervalo de temperatura que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 0°C a aproximadamente 5°C; aproximadamente 5°C a aproximadamente 15°C; aproximadamente 15°C a
20 aproximadamente 20°C; aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C; aproximadamente 25°C a aproximadamente 30°C; aproximadamente 30°C a

aproximadamente 35°C; aproximadamente 35°C a aproximadamente 40°C y aproximadamente 40°C a aproximadamente 45°C. Por consiguiente, cada etapa del método puede llevarse a cabo en un intervalo de temperatura diferente o similar.

MÉTODOS SUGERIDOS

5 A modo de ejemplo, después del procedimiento de maduración de ovocitos, puede utilizarse un procedimiento de IVF, un procedimiento de cultivo *in vitro* y un procedimiento de cocultivo con la invención. El entendido en la técnica sabrá que pueden existir variaciones para estos métodos y que estos métodos no deben interpretarse como limitantes de la funcionalidad de la invención actual. Estos métodos son únicamente
10 ilustrativos.

1. Recolección de ovocitos Recolectar los ovocitos del matadero, lavar una vez con aproximadamente 3mL de medio de lavado Hepes y una vez con TCM-199 (Invitrogen, Carlsbad, CA) + suero bovino fetal al 10% (FBS). Cultivar en un medio de maduración durante 22 horas en una incubadora de CO₂ a 38.5°C. En una realización, el medio de
15 maduración contiene TCM-199, FBS, piruvato, gonadotropina coriónica (por ejemplo, Chorulon (Intervet, Summit NJ)), hormona de estimulación de folículos (FSH) (por ejemplo, Folltropin (Bioniche, Belleville, Canadá)), estradiol y al menos un antibiótico. En una realización adicional, puede utilizarse Amikacina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como antibiótico. En otra realización, el medio de maduración también puede comprender
20 hormona luteinizante.

En una realización, el medio de maduración puede comprender de 5 a 20 ml de TCM-199 Earl's; de 0.5 a 2ml de FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); de 10 a 30 µl de piruvato (preparado mediante la adición de 0.05 a 0.20 g de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 5 a 20 ml de solución salina); de 50 a 200 µl de gonadotropina coriónica (preparada mediante la adición de 5 a 20 UI de Chorulon (Intervet, Summit NJ) a 5 a 20 ml de TCM-199 Earl's); 5 a 20 µl de FSH (preparada mediante la adición de 0.001 a 0.01 g de Folltropin (Bioniche, Belleville, Canadá) a 5 a 20 ml de TCM-199 Earl's); 5 a 20 µl de estradiol (preparado mediante la adición de 0.001 a 0.05 g de estradiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 5 a 20 ml de Etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)); y 10 a 30 µl de Amikacina (preparada mediante la adición de 0.1 a 1 g de sal de sulfato de Amikacina (Sigma-Aldrich) a 20 a 40 ml de solución salina). En realizaciones alternativas, el medio de maduración puede comprender los componentes mencionados anteriormente mediante el uso de diferentes volúmenes pero en la misma proporción entre sí, por ejemplo en una realización, el medio de maduración puede comprender de 10 a 40 ml de TCM-199; de 1 a 4 ml de FBS; de 20 a 60 µl de piruvato de sodio, etc. En una realización adicional, el medio de maduración comprende las preparaciones anteriores de TCM-199 Earl's, FBS, piruvato, gonadotropina coriónica, FSH, estradiol y un antibiótico en una relación aproximada de 9 : 1 : 0.02 : 0.1 : 0.01: 0.01 : 0.02 en volumen respectivamente.

2. Fecundación *in vitro*. Quitar los cúmulos de células de los ovocitos maduros. Transferirlos a una placa de fecundación y regresarlos a la incubadora de CO₂. Descongelar

los tubillos de semen congelados mediante el uso de procedimientos estándar, centrifugar en 800µL de gradiente de esperma puro (Nidacon, Molndal, Suecia) o Percoll o un gradiente similar a 2500 RPM durante 10 minutos para quitar los componentes de huevo, glicerol y otros restos. Eliminar el sobrenadante, dejando un gránulo suelto de esperma vivo. Combinar los gránulos mediante el uso de una pequeña cantidad de medio de fecundación y volver a granular a 1500 RPM durante 3 minutos. Quitar cuidadosamente el sobrenadante. Después mezclar suavemente el granulado. Después de determinar la dosis de inseminación deseada, inseminar los ovocitos mediante la adición de esperma al gránulo, después cultivar en una placa y volver a la incubadora de CO₂ durante aproximadamente 18 a 22 horas.

3. Cultivo *in vitro*. Quitar los presuntos cigotos de la placa de fecundación y transferirlos a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. Dejar que los cigotos formen un gránulo suelto y eliminar el exceso de medio para formar una relación 1:1 de gránulo y solución. Enjuagar el tubo Eppendorf con TCM-199, colocar el contenido en una placa y lavar con un medio de BSA. A continuación cultivar los presuntos cigotos (desechar los ovocitos desfigurados, así como los ovocitos con citoplasma de color amarillo o citoplasma vacuolado) en una incubadora de dos gases (CO₂ al 5%, O₂ al 5%) a 38.5°C durante aproximadamente 48 horas.

4. Cocultivo. Transferir los cigotos escindidos a placas de cocultivo que contienen el cúmulo de células de los ovocitos maduros y medio FBS cubierto con aceite mineral e incubar en una incubadora de CO₂ a 38.5°C hasta que sea necesario.

5. Evaluaciones de movilidad de espermatozoides por CASA. Puede realizarse una comparación de las cámaras de visión y deslizadores en una variedad de instrumentos IVOS, que por ejemplo puede ser únicamente IVOS de Hamilton-Thorne (Hamilton-Thorne, Beverly, MA). Ajustes de los instrumentos: Captura de imagen; cuadros por segundo = 60; número de cuadros = 30; detección celular; contraste mínimo = 50; tamaño celular mínimo = 5; tamaño celular por defecto = 5; intensidad celular = 50; velocidad de trayectoria de células progresiva = 50 $\mu\text{m/s}$; rectilineidad $\geq 70\%$; células lentas ($\mu\text{m/s}$); velocidad de trayectoria promedio (VAP, $<30 \mu\text{m/s}$), velocidad en línea recta (VSL, $<15 \mu\text{m/s}$). Las variables de movilidad CASA medidas pueden ser el porcentaje de espermatozoides móviles total (móvil), porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles (progresivo), VAO, VSL, velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), desplazamiento de cabeza lateral promedio (ALK, μm) y la cantidad de veces que las cabezas de espermatozoides cruzan la trayectoria media (BCF, Hz), movilidad del espermatozoides en línea recta (STR, %) y movilidad lineal del espermatozoides (LIN, %). Ver, por ejemplo, Lenz, RW, et al., J Anim Sci (2011) 89:383-388, incorporada en la presente a modo de referencia en su totalidad.

Otro aspecto de la presente invención implica el uso de una muestra de célula espermática tratada con un OSR en AI. AI en la presente invención incluye un método por el cual la muestra de célula espermática recién extraída o descongelada se utiliza para inseminar por medio del pasaje de la muestra de semen o espermatozoides por el tracto reproductivo femenino, con o sin una herramienta accesorio como una pistola de inseminación artificial, un catéter o una pipeta.

Las muestras de semen congelado pueden estar contenidas en tubillos de semen que se descongelan antes del procedimiento de AI mediante el uso de métodos estándar. En ciertas realizaciones de la invención, los tubillos de semen contienen de aproximadamente 0.25 a 0.5 ml de líquido y habitualmente son suficientes para una única inseminación.

5 Para aumentar la cantidad de crías/hijos que un individuo del sexo femenino puede producir, se han desarrollado técnicas de transferencia de embriones (como MOET) y son bien conocidas por los entendidos en la técnica. Las técnicas de transferencia de embriones convencionales incluyen inyección en hembras con hormonas adecuadas para hacer que produzcan múltiples huevos (ovocitos) en un único ciclo estral. Este proceso habitualmente
10 se denomina como superovulación. Cada hembra se insemina artificialmente con una muestra de célula espermática de un macho recién extraída o que fue crioconservada.

En otro aspecto de la invención, los cigotos y/o embriones de hembras inseminadas pueden recuperarse y después cultivarse y/o crioconservarse/vitrificarse.

Ejemplo 1

15 Se utilizó una muestra de semen de cada toro como control mientras que a las muestras de semen restantes se les agregó vitamina B12, como antioxidante, en las respectivas concentraciones de 0.5mg/ml y 0.25mg/ml. Para cada muestra se agregó la misma concentración de vitamina B12 (i) durante el proceso de tinción y (ii) en el líquido de recepción del recipiente de recolección. Las muestras de control no contenían vitamina
20 B12. Las muestras de espermatozoides se clasificaron en un modo de “alta pureza” y el espermatozoides clasificado por sexo recolectado se diluyó con un criodiluyente que en algunos casos

nuevamente contenía la misma concentración de vitamina B12 y las muestras se congelaron. Tres horas después del congelamiento (que es un marco de tiempo estándar para llevar a cabo las evaluaciones de control de calidad sobre las muestras de esperma clasificadas congeladas y descongeladas) las muestras descongeladas se colocaron en
5 CASA, una máquina que proporciona varios datos del esperma, como la información de movilidad y movilidad progresiva. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 1 y la movilidad y movilidad progresiva se representan gráficamente en la figura 2.

En las tablas a continuación: VAP (velocidad de trayectoria promedio ($\mu\text{m/s}$)); VSL (velocidad en línea recta ($\mu\text{m/s}$)); VCL (velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$)); ALH
10 (desplazamiento de cabeza lateral promedio (μm)); BCF (cantidad de veces que las cabezas de esperma cruzan la trayectoria media en Hz); STR (porcentaje de movilidad del esperma en línea recta); LIN (porcentaje de movilidad lineal del esperma); PIA (porcentaje de acrosomas intactos); movilidad (porcentaje de esperma móvil) y movilidad progresiva (porcentaje de esperma progresivamente móvil).

15 Los resultados de la adición de dos etapas representan tratamientos con vitamina B12 presentes en la misma concentración indicada en el líquido de recepción del recipiente de recolección y en el diluyente crioprotector antes de congelar la muestra únicamente (congelamiento de 2 etapas; - + +); los resultados de la adición de tres etapas indican que la misma concentración de vitamina B12 se agregó durante la etapa de tinción, la etapa de
20 recolección (en el líquido de recepción del recipiente de recolección) y en el diluyente crioprotector antes del congelamiento de la muestra (3 etapas). No existe correlación con

respecto a los nombres asignados de forma aleatoria como “Toro A”. El Toro A del ejemplo 5 no es el mismo toro que el Toro A del ejemplo 7.

TABLA 1: Movilidad (2 etapas y 3 etapas) (3 horas después del congelamiento)

	Células totales	Móvil (%)	Progresivamen te móvil (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Toro 1											
Control	562	59.5	33.5	54	47	95.5	4	21.5	87.5	51	73.5
0.5mg/ml, cong. 2 etapas	925	63.5	26	56	45	94	4	23	86.5	49	74
0.25mg/ml, 3 etapas	815	70.5	40.5	55	48	92	4	23.5	87.5	53	83
Toro 2											
Control	529	54.5	41.5	61	53.5	107.5	4.5	23	87.5	51.5	64
0.5mg/ml, cong. 2 etapas	269	70.5	47	77	66	108	4	21.5	85.5	61	84
0.25mg/ml, 3 etapas	693	67	53.5	68	55	111.5	4.5	24	87	51	79.5
Toro 3											

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

Control	599	47.5	18	49.5	42.5	84.5	4	20.5	86.5	51.5	52.5
0.5mg/ml, cong. 2 etapas	800	74.5	53.5	56	51	98	4	22.5	84.5	52.5	87
0.25mg/ml, 3 etapas	656	70	48.5	59	50	101	4	24	85.5	51	80
Toro 4											
Control	602	65.5	33.5	53.5	45.5	89.5	4	23.5	86	52.5	72.5
0.5mg/ml, cong. 2 etapas	874	81.5	50	60	53	109	5	26	83.5	49	88
0.25mg/ml, 3 etapas	1059	81	25.5	43	51	88.5	5	23	82.5	47	86
Toro 5											
Control	638	49.5	13	45.5	38.5	86.5	5	18	84	45.5	63.5
0.5mg/ml, cong. 2 etapas	842	51	33	50	47	101	5	20.5	84	47	79

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

0.25mg/ml, 3 etapas	787	70	40.5	61	48	106.5	5	21.5	84.5	47	80
---------------------	-----	----	------	----	----	-------	---	------	------	----	----

Ejemplo 2

En otra serie de experimentos, los resultados de CASA con respecto a la movilidad y a la movilidad progresiva después de 4.5 horas después del descongelamiento de las muestras clasificadas por sexo contra un control se muestran a continuación en la tabla 2.

- 5 Los resultados (congelamiento de 2 etapas) indican que la vitamina B12 en la misma concentración se encontraba presente en el líquido de recepción del recipiente de recolección y en el diluyente crioprotector antes de congelar la muestra; los resultados (3 etapas) indican que se agregó la misma concentración de vitamina B12 durante la etapa de tinción, la etapa de recolección (en el líquido de recepción del recipiente de recolección) y
- 10 en el diluyente crioprotector antes de congelar la muestra.

- Con respecto al “Toro A”, los dos conjuntos de resultados mostrados se obtuvieron en dos días diferentes mediante el uso de muestras descongeladas del mismo lote de esperma clasificado inicialmente. En ambos casos la concentración de vitamina B12 fue 1mg/ml. Para todos los toros en la tabla a continuación a menos que se indique lo contrario,
- 15 la concentración de vitamina B12 agregada también fue de 1mg/ml.

TABLA 2: Movilidad (4.5 horas después del descongelamiento)

	Células totales	Móvil	Progresivamente móvil
Toro A			

control	322	38	0
1 mg/ml - cong. 2 etapas	250	41	8
1 mg/ml - 3 etapas	287	64	37
Toro A (día 2)			
control	328	46	4
1 mg/ml - cong. 2 etapas	433	71	31
1 mg/ml - 3 etapas	487	64	11
Toro B			
control	298	33	1
1 mg/ml - cong. 2 etapas	316	22	1
1 mg/ml - 3 etapas	237	59	19
Toro C			
control	403	52	1
1 mg/ml - cong. 2 etapas	432	76	43
1 mg/ml - 3 etapas	613	62	2
Toro D			
control	644	37	3
1 mg/ml - 3 etapas	400	59	9

Toro E			
control	653	41	1
1 mg/ml - 3 etapas	648	52	1
Toro F			
control	638	39	7
0.5 mg/ml - 3 etapas	761	51	16
0.25 mg/ml - 3 etapas	730	60	23
Toro G			
control	588	41	13
0.5 mg/ml - 3 etapas	162	65	57
0.25 mg/ml - 3 etapas	1003	56	32

Ejemplo 3

En un experimento adicional, se verificó la movilidad y movilidad progresiva a las 3.75 horas después del descongelamiento de una muestra de semen clasificada por sexo
5 tratada con un antioxidante. No se agregó OSR a la muestra de control. La muestra de control derivó de un único toro. Se agregó vitamina B12 en una concentración de 0.25 mg/ml a la muestra de prueba durante la etapa de tinción, la etapa de recolección (en el

fluido de recepción del recipiente de recolección) y en el diluyente crioprotector antes del congelamiento de la muestra. Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

TABLA 3: Movilidad (3.75 horas después del descongelamiento)

	Células totales	Móvil (%)	Progresivam ente móvil (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	$\sqrt{\text{SL}}$ ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Toro 1											
Control	452	7	0	37	28	71	3	16	74	40	41
0.25mg/ml, 3 etapas	536	39	5	40	34	76	5	17	85	45	70

Ejemplo 4

Se diseñó un experimento para probar el efecto de las células espermáticas tratadas con OSR sobre el desarrollo de los huevos fecundados con dichas células espermáticas. En este experimento, el semen de toro de dos toros se clasificó por sexo con citometría de flujo, con vitamina B12 presente en concentraciones iguales en el medio utilizado para teñir las células espermáticas, en el líquido de recepción del recipiente de recolección y en el diluyente crioprotector antes de congelar la muestra clasificada por sexo (3 etapas). Para cada toro se probaron tres concentraciones diferentes de vitamina B12: 0.05mg/ml, 0.15mg/ml y 0.25mg/ml. Las muestras de control no se trataron con vitamina B12.

Se recolectaron los ovocitos del matadero y se lavaron una vez con aproximadamente 3mL de medio de lavado Hepes y una vez con TCM-199 + FBS al 10%. Los ovocitos se cultivaron en un medio de maduración durante 22 horas en una incubadora de CO₂ a 38.5°C. Los cúmulos de células se quitaron de los ovocitos maduros, se transfirieron a una placa de fecundación y se regresaron a la incubadora de CO₂.

Los tubillos de semen congelados se descongelaron mediante el uso de procedimientos estándar y se centrifugaron en 800μL de gradiente de esperma puro a 2500 RPM durante 10 minutos para quitar los huevos, el glicerol y otros restos. El sobrenadante se eliminó, dejando un gránulo suelto de esperma vivo. Los gránulos se combinaron mediante el uso de una pequeña cantidad de medio de fecundación y se volvieron a granular a 1500 RPM durante 3 minutos. A continuación el sobrenadante se quitó cuidadosamente y el granulado se mezcló suavemente. Después de determinar la dosis de

inseminación deseada, los ovocitos maduros se inseminaron mediante la adición de espermatozoides al gránulo, se cultivaron en una placa y se regresaron a la incubadora de CO₂ durante aproximadamente 18 a 22 horas.

Se quitaron los presuntos cigotos de la placa de fecundación y se transfirieron a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. Los cigotos se dejaron formar un gránulo suelto y se eliminó el exceso de medio para formar una relación 1:1 de gránulo y solución. El tubo Eppendorf se sometió a agitación vorticial durante 90 segundos y después se enjuagó con TCM-199. Los contenidos se colocaron en una placa y después se lavaron con un medio de BSA. A continuación los presuntos cigotos se cultivaron en una incubadora de dos gases (CO₂ al 5%, O₂ al 5%) a 38.5°C durante aproximadamente 48 horas. Los cigotos escindidos se transfirieron a placas de cocultivo que contienen el cúmulo de células de los ovocitos maduros y medio FBS cubierto con aceite mineral y se incubaron en una incubadora de CO₂ a 38.5°C.

Los embriones se observaron 7 días después de IVF para verificar: Cig (cantidad de cigotos colocados en cultivo); 4-2C (cantidad de cigotos que experimentaron la transición de 2 células a 4 células 48 horas después de IVF); 8C (cantidad de cigotos con 8 células 48 horas después de IVF); 8C% (porcentaje de cigotos que tenían 8 células 48 horas después de IVF); % de escisión (porcentaje escindido 48 horas después de IVF); C1 (cantidad de blastocistos expandidos y en incubación y blastocistos incubados 7 días después de IVF); C1- (cantidad de blastocistos 7 días después de IVF); y C2 (cantidad de blastocistos prematuros y mórulas compactas 7 días después de IVF), embriones totales (cantidad total

de blastocistos = C1+ C1- + C2); % de blastocistos (porcentaje de cigotos cultivados que resultan en la formación de blastocistos); # de incubación (cantidad de embriones que se desprenden de la zona pelúcida en la preparación para la implantación observada a los 8.5 días después de IVF); y % de incubación (porcentaje de embriones que se desprendieron de

5 la zona). Los resultados se muestran en la tabla 4 a continuación.

TABLA 4: IVF - Embrión / Fecundación (3 etapas)

	Cig	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Embriones totales	% blastocistos	# incubación	% incubación
Toro A												
Control	96	36	8	8.3	45.8	1	0	5	6	6.3	2	33.3
Control	68	19	7	10.3	38.2	0	0	2	2	2.9	0	0.0
Control	91	31	19	20.9	54.9	2	3	10	15	16.5	5	33.3
Total/ Promedio	255	86	34	(13.3)	(47.1)	3	3	17	23	(9.0)	7	(30.4)
0.05mg/ml	87	20	3	3.4	26.4	0	0	1	1	1.1	0	0.0
0.05mg/ml	95	26	9	9.5	36.8	1	0	1	2	2.1	1	50.0
0.05mg/ml	94	20	11	11.7	33.0	0	3	1	4	4.3	1	25.0

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

Total/ Promedio	276	66	23	(8.3)	(32.2)	1	3	3	7	(2.5)	2	(28.6)
0.15mg/ml	89	25	4	4.5	32.6	0	1	4	5	5.6	0	0.0
0.15mg/ml	90	29	9	10.0	42.2	1	0	4	5	5.6	3	60.0
0.15mg/ml	91	24	6	6.6	33.0	2	1	4	7	7.7	3	42.9
Total/ Promedio	270	78	19	(7.0)	(35.9)	3	2	12	17	(6.3)	6	(35.3)
0.25mg/ml	91	33	6	6.6	42.9	0	2	3	5	5.5	2	40.0
0.25mg/ml	93	38	20	21.5	62.4	4	2	10	16	17.2	10	62.5
0.25mg/ml	91	26	16	17.6	46.2	2	3	10	15	16.5	6	40.0
Total/ Promedio	275	97	42	(15.3)	(50.5)	6	7	23	36	(13.1)	18	(50.0)

Toro B												
Control	91	15	35	38.5	54.9	3	3	8	14	15.4	9	64.3
Control	90	25	29	32.2	60.0	4	5	9	18	20.0	10	55.6
Control	92	20	33	35.9	57.6	7	6	12	25	27.2	15	60.0
Total/ Promedio	273	60	97	(35.5)	(57.5)	14	14	29	57	(20.9)	34	(59.6)
0.05mg/ml	90	18	40	44.4	64.4	2	4	13	19	21.1	9	47.4
0.05mg/ml	92	23	27	29.3	54.3	4	2	9	15	16.3	7	46.7
0.05mg/ml	93	22	27	29.0	52.7	5	3	13	21	22.6	8	38.1
Total/ Promedio	275	63	94	(34.2)	(57.1)	11	9	35	55	(20.0)	24	(43.6)
0.15mg/ml	96	21	38	39.6	61.5	6	7	10	23	24.0	17	73.9

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

0.15mg/ml	93	32	14	15.1	49.5	2	3	6	11	11.8	6	54.5
0.15mg/ml	100	21	29	29.0	50.0	4	4	14	22	22.0	9	40.9
Total/ Promedio	289	74	81	(28.0)	(53.6)	12	14	30	56	(19.4)	32	(57.1)
0.25mg/ml	92	24	34	37.0	63.0	5	3	11	19	20.7	14	73.7
0.25mg/ml	96	31	23	24.0	56.3	1	3	3	7	7.3	5	71.4
Total/ Promedio	188	55	57	(30.3)	(59.6)	6	6	14	26	(13.8)	19	(73.1)

Ejemplo 5

Se realizó un experimento similar al del ejemplo 4 para probar el efecto de las células espermáticas tratadas con OSR sobre el desarrollo de los huevos fecundados mediante el uso de una concentración más alta de antioxidante, en comparación con una de las concentraciones utilizadas anteriormente. Las muestras de semen de dos toros de diferente raza (uno Holstein; uno Jersey) se clasificaron por sexo con citometría de flujo, nuevamente con el uso de vitamina B12 como antioxidante, presente en concentraciones iguales durante la tinción, en el líquido de recepción del recipiente de recolección y en el diluyente crioprotector antes de congelar la muestra clasificada por sexo (3 etapas). Para cada toro las dos concentraciones de vitamina B12 probadas fueron: 0.5mg/ml y 0.25mg/ml. Las muestras de control no se trataron con vitamina B12. Todas las etapas experimentales se llevaron a cabo en la misma forma que en el ejemplo 4. Los resultados se muestran en la tabla 5 a continuación.

TABLA 5: IVF - Fecundación de embriones (3 etapas)

	Cig	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Embriones totales	% blasto- cistos	# incu- bación	% incu- bación
Toro A (Holstein)												
Control	91	25	35	38.5	65.9	3	2	4	9	9.9	3	33.3
Control	93	40	19	20.4	63.4		1	2	3	3.2	0	0.0
Control	98	25	25	25.5	51.0	3	6	5	14	14.3	6	42.9
Total/ Promedio	282	90	79	28.0	(60.1)	6	9	11	26	(9.2)	9	(34.6)
0.25mg/ml	97	25	39	40.2	66.0	6	9	5	20	20.6	8	40.0
0.25mg/ml	97	34	30	30.9	66.0	5	6	5	16	16.5	4	25.0
0.25mg/ml	97	23	33	34.0	57.7	6	7	6	19	19.6	9	47.4
Total/ Promedio	291	82	102	35.1	(63.2)	17	22	16	55	(18.9)	21	(38.2)

0.5mg/ml	94	25	34	36.2	62.8	0	3	3	6	6.4	1	16.7
0.5mg/ml	95	29	30	31.6	62.1	1	7	7	15	15.8	4	26.7
0.5mg/ml	93	18	35	37.6	57.0	5	7	8	20	21.5	11	55.0
Total/ Promedio	282	72	99	35.1	(60.6)	6	17	18	41	(14.5)	16	(39.0)
Toro B (Jersey)												
Control	97	39	39	40.2	80.4	5	5	3	13	13.4	7	53.8
Control	100	22	12	12.0	34.0	4	5		9	9.0	2	22.2
Control	100	22	29	29.0	51.0	2	5	1	8	8.0	3	37.5
Total/ Promedio	297	83	80	26.9	(55.1)	11	15	4	30	(10.1)	12	(40.0)
0.25mg/ml	94	25	45	47.9	74.5	5	9	4	18	19.1	12	66.7
0.25mg/ml	99	36	20	20.2	56.6	7	6	6	19	19.2	6	31.6

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

0.25mg/ml	99	17	46	46.5	63.6	5	7	8	20	20.2	9	45.0
Total/ Promedio	292	78	111	38.0	(64.8)	17	22	18	57	(19.5)	27	(47.4)
0.5mg/ml	100	40	34	34.0	74.0	4	6	1	11	11.0	5	45.5
0.5mg/ml	95	31	24	25.3	57.9	5	11	7	23	24.2	6	26.1
0.5mg/ml	99	15	46	46.5	61.6	8	5	5	18	18.2	9	50.0
Total/ Promedio	294	86	104	35.4	(64.5)	17	22	13	52	(17.7)	20	(38.5)

Ejemplo 6

Se realizó otro experimento similar al de los ejemplos 4 y 5 para probar el efecto reproducible de las células espermáticas tratadas con OSR con respecto a un único toro mediante el control de desarrollo de embriones. Se tomaron muestras del Toro A
5 (Holstein) tres veces diferentes; se tomaron muestras del Toro B cinco veces diferentes; se tomaron muestras del Toro C una única vez; todas las muestras de semen se sometieron a procedimientos de clasificación por sexo estándar mediante el uso de citometría de flujo con vitamina B12 como el OSR a 0.25 mg/ml durante las etapas de tinción, recolección en el líquido de recepción y antes de la crioconservación (3 etapas). Las muestras de control
10 no se trataron con vitamina B12. Todas las etapas experimentales se llevaron a cabo en la misma forma que en el ejemplo 4. Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación.

TABLA 6: IVF (3 etapas) - Reproducibilidad

Toro A (Holstein)	Cig	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Embriones totales	% blasto- cistos	% de congela- miento	% incubación
Ensayo 1												
Control	507	85	119	23.5	40.2	34	19	31	84	16.6	10.5	
0.25mg/ml	434	92	100	23.0	44.2	27	14	44	85	(19.6)	9.4	
Ensayo 2												
Control	993	238	287	28.9	52.9	54	26	86	166	16.7	8.1	
0.25mg/ml	884	204	222	25.1	48.2	81	36	128	245	(27.7)	13.2	
Ensayo 3												
Control	907	209	215	23.7	46.7	70	27	90	187	20.6	10.7	
0.25mg/ml	1053	230	285	27.1	48.9	83	39	129	251	(23.8)	11.6	

Promedio - Control								(18.2)	(9.6)	
Promedio - 0.25 mg/ml								(24.5)	(11.8)	

Toro B (Holstein)	Cig	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Embriones totales	% blasto- cistos	% de congel- amiento %	% incubación
Ensayo 1												
Control	507	85	119	23.5	40.2	34	19	31	84	16.6	10.5	
0.25mg/ml	434	92	100	23.0	44.2	27	14	44	85	(19.6)	9.4	
Ensayo 2												
Control	993	238	287	28.9	52.9	54	26	86	166	16.7	8.1	
0.25mg/ml	884	204	222	25.1	48.2	81	36	128	245	(27.7)	13.2	
Ensayo 3												

Control	907	209	215	23.7	46.7	70	27	90	187	20.6	10.7	
0.25mg/ml	1053	230	285	27.1	48.9	83	39	129	251	(23.8)	11.6	
Ensayo 4												
Control	550	122	177	32.2	54.4	12	19	56	87	15.8	5.6	
0.25mg/ml	595	124	183	30.8	51.6	12	8	52	72	(12.1)	3.4	
Ensayo 5												
Control	596	107	159	26.7	44.6	31	21	83	135	22.7	8.7	
0.25mg/ml	636	137	185	29.1	50.6	27	24	79	130	(20.4)	8.0	
Promedio - Control										(18.5)	(8.8)	
Promedio - 0.25 mg/ml										(21.7)	(9.7)	

Toro C	Cig	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Embriones totales	% blasto- cistos	% de congel amiento	% incu- bación
Ensayo 1												
Control	454	113	265	58.4	83.3	21	17	49	87	(19.2)	(8.4)	
0.25mg/ml	509	104	335	65.8	86.2	31	27	62	120	(23.6)	(11.4)	

Ejemplo 7

Se realizó un experimento a mayor escala para probar de forma adicional la reproducibilidad de lo que se realizó en los ejemplos 6 y 7, pero probando cinco toros cada tres intervalos de tiempo separados. Se tomaron muestras de semen de cinco toros y se
5 clasificaron por sexo mediante el uso de citometría de flujo de conformidad con los procedimientos anteriores y se trataron con 0.25 mg/ml de vitamina B12 como el OSR (3 etapas). Las muestras de control no se trataron con vitamina B12.

TABLA 7: Efecto promedio (Mezcla de Holstein y Jersey)

	Cig	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Embriones totales	% blasto- cistos	# incu-bación	% incu- bación
Control-A1	993	238	287	28.9	52.9	54	26	86	166	16.7		
Control-A2	507	85	119	23.5	40.2	34	19	31	84	16.6		
Control-A3	907	209	215	23.7	46.7	70	27	90	187	20.6		
Control-B1	96	36	8	8.3	45.8	1	0	5	6	6.3	2	33.3
Control-B2	68	19	7	10.3	38.2	0	0	2	2	2.9	0	0.0
Control-B3	91	31	19	20.9	54.9	2	3	10	15	16.5	5	33.3
Control-C1	91	15	35	38.5	54.9	3	3	8	14	15.4	9	64.3
Control-C2	90	25	29	32.2	60.0	4	5	9	18	20.0	10	55.6
Control-C3	92	20	33	35.9	57.6	7	6	12	25	27.2	15	60.0
Control-D1	97	39	39	40.2	80.4	5	5	3	13	13.4	7	53.8
Control-D2	100	22	12	12.0	34.0	4	5		9	9.0	2	22.2

Control-D3	100	22	29	29.0	51.0	2	5	1	8	8.0	3	37.5
Control-E1	91	25	35	38.5	65.9	3	2	4	9	9.9	3	33.3
Control-E2	93	40	19	20.4	63.4		1	2	3	3.2	0	0.0
Control-E3	98	25	25	25.5	51.0	3	6	5	14	14.3	6	42.9
Total/ Promedio	3514	851	911	25.9	(50.1)	192	113	268	573	(16.3)	62	(10.8)
0.25 –A1	884	204	222	25.1	48.2	81	36	128	245	27.7		
0.25 –A2	434	92	100	23.0	44.2	27	14	44	85	19.6		
0.25 –A3	1053	230	285	27.1	48.9	83	39	129	251	23.8		
0.25 –B1	91	33	6	6.6	42.9	0	2	3	5	5.5	2	40.0
0.25 –B2	93	38	20	21.5	62.4	4	2	10	16	17.2	10	62.5
0.25 –B3	91	26	16	17.6	46.2	2	3	10	15	16.5	6	40.0
0.25 –C1	92	24	34	37.0	63.0	5	3	11	19	20.7	14	73.7

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

0.25 -C2	96	31	23	24.0	56.3	1	3	3	7	7.3	5	71.4
0.25 -C3												
0.25 -D1	94	25	45	47.9	74.5	5	9	4	18	19.1	12	66.7
0.25 -D2	99	36	20	20.2	56.6	7	6	6	19	19.2	6	31.6
0.25 -D3	99	17	46	46.5	63.6	5	7	8	20	20.2	9	45.0
0.25 -E1	97	25	39	40.2	66.0	6	9	5	20	20.6	8	40.0
0.25 -E2	97	34	30	30.9	66.0	5	6	5	16	16.5	4	25.0
0.25 -E3	97	23	33	34.0	57.7	6	7	6	19	19.6	9	47.4
Total/ Promedio	3417	838	919	26.9	(51.4)	237	146	372	755	(22.1)	85	(11.3)

Ejemplo 8

En un experimento adicional, se verificó la movilidad y movilidad progresiva después del descongelamiento mediante el uso de CASA a las 0, 3 y 5 horas después del descongelamiento de muestras de semen clasificadas por sexo (clasificadas mediante el uso de citometría de flujo) tratadas con vitamina B12 como el antioxidante. No se agregó OSR a las muestras de control. Las muestras de semen provenían de dos toros Holstein. Se agregó vitamina B12 en una concentración de 0.25 mg/ml a las muestras de prueba durante la etapa de tinción, la etapa de recolección (en el fluido de recepción del recipiente de recolección) y en el diluyente crioprotector antes del congelamiento de la muestra (3 etapas). Los resultados se muestran en la tabla 8 a continuación.

TABLA 8: Movilidad después del descongelamiento (3 etapas)

Toro A	Células totales	Móvil (%)	Progres- ivamente móvil (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
0 horas después del descongelamiento:											
Toro A - Control	1884	77	53	107	81	211	9	23	76	40	
Toro A - Control	1275	74	51	99	75	198	9	24	77	41	90
Promedio		(76)	(52)	103	78	205	9	24	77	41	
Toro A - 0.25	1074	73	51	89	68	183	8	26	77	40	
Toro A - 0.25	1519	69	50	101	78	195	8	27	78	43	90
Promedio		(71)	(51)	95	73	189	8	27	78	42	

3 horas después del descongelamiento:											
Toro A - Control	1064	48	3	38	29	76	6	14	77	40	56
Toro A - Control	683	53	7	44	36	80	5	17	84	46	63
Promedio		(50)	(5)	41	32.5	78	5.5	15.5	80.5	43	59.5
Toro A - 0.25	870	64	22	48	39	84	8	14	77	41	86
Toro A - 0.25	978	46	7	41	31	83	8	14	77	38	76
Promedio		(55)	(15)	45	35	84	8	14	77	40	81
5 horas después del descongelamiento:											
Toro A - Control	903	40	8	14	11	25	3	7	14	9	52
Toro A - Control	517	15	1	12	10	18	2	10	17	18	60

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

Promedio		(27.5)	(4.5)	13	10.5	21.5	2.5	8.5	15.5	13.5	56
Toro A - 0.25	708	61	26	17	17	23	2	6	13	12	79
Toro A - 0.25	747	34	7	20	16	28	3	8	14	13	72
Promedio		(47.5)	(16.5)	18.5	16.5	25.5	2.5	7	13.5	12.5	75.5

Toro B	Células totales	Móvil (%)	Progres- ivamente móvil (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
0 horas después del descongelamiento:											
Toro B - Control	1878	73	57	88	73	153	7	27	83	49	
Toro B - Control	1706	72	54	83	69	142	6	28	84	51	90

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

Promedio		(73)	(55.5)	85.5	71	148	7	28	84	50	
Toro B - 0.25	1804	79	58	85	70	145	6	28	83	51	
Toro B - 0.25	1150	79	54	81	67	143	6	29	84	51	90
Promedio		(79)	(56)	83	69	144	6	29	84	51	
3 horas después del descongelamiento:											
Toro B - Control	666	30	10	39	25	80	8	16	66	33	60
Toro B - Control	670	50	12	45	37	85	6	16	82	44	72
Promedio		(50)	(11)	42	31	82.5	7	16	74	38.5	66
Toro B - 0.25	928	56	18	50	39	96	6	18	80	42	83
Toro B - 0.25	772	42	12	46	37	89	6	18	80	42	82
Promedio		(49)	(15)	48	38	93	6	18	80	42	82.5

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

5 horas después del descongelamiento:											
Toro B - Control	539	0	0	40	16	52	0	26	40	31	46
Toro B - Control	609	0	0	35	26	44	0	71	75	39	61
Promedio		(0)	(0)	37.5	21	48	0	48.5	57.5	35	53.5
Toro B - 0.25	902	43	4	41	28	85	7	14	70	34	83
Toro B - 0.25	721	21	0	38	21	70	4	14	57	32	73
Promedio		(32)	(2)	39.5	24.5	77.5	5.5	14	63.5	33	78

Ejemplo 9

En un experimento adicional, se verificó la movilidad y movilidad progresiva a las 0 horas y a las 3 horas después del descongelamiento de muestras de semen clasificadas por sexo (clasificadas mediante el uso de citometría de flujo) tratadas con el antioxidante, vitamina B12. No se agregó OSR a la muestra de control. Las muestras de semen
5 provenían de dos razas diferentes de toro, una Holstein, la otra Texas Longhorn. Se agregó vitamina B12 en una concentración de 0.25 mg/ml a las muestras de prueba (i) durante la etapa de tinción (tinción en 1 etapa); (ii) la etapa de tinción y la etapa de recolección (en el fluido de recepción del recipiente de recolección) (tinción en 2 etapas); (iii) en la etapa de
10 tinción, la etapa de recolección y la etapa de congelamiento (en el diluyente crioprotector antes del congelamiento de la muestra) (3 etapas) - tabla 9 (A) durante 3 horas y (B) durante 0 horas; o (iv) únicamente antes de la etapa de crioconservación (congelamiento en 1 etapa) - tabla 9 (C) durante 3 horas.

TABLA 9 (A): Movilidad 3 horas después del descongelamiento (3 etapas; tinción en 2 etapas; tinción en 1 etapa)

Toro 1 (TL) 3 horas después del descongelamiento	Células totales	Móvil (%)	Progres- ivamente móvil (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Control		(12)	(3)	42	35	77	3	19	83	46	23
3 etapas (+ + +)		42	25	55	47	101	5	23	84	48	73
tinción en 2 etapas (+ + -)		25	9	47	41	85	5	21	87	49	47
tinción en 1 etapa (+ - -)		37	23	56	47	84	5	16	85	57	52

Toro 2 (Jersey) 3 horas después del descongelamiento	Células totales	Móvil (%)	Progres- ivamente móvil (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)

Control		(72)	(63)	70	59	108	5	19	85	56	72
3 etapas (+ + +)		75	70	81	74	124	5	22	88	58	80
tinción en 2 etapas (+ + -)		57	35	60	50	105	5	19	84	48	78
tinción en 1 etapa (+ - -)		47	32	59	49	98	5	19	84	51	71

Promedio	Células totales	Móvil (%)	Progres- ivamente móvil (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Promedio - Control		(42)	(33)	56	47	92	4	19	84	51	48
3 etapas (+ + +)		58	47	68	60	112	5	23	86	53	77
tinción en 2 etapas (+ + -)		41	22	53	45	95	5	20	85	48	63
tinción en 1 etapa (+ - -)		42	28	57	48	91	5	18	85	54	61

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

TABLA 9 (B) - Movilidad 0 horas después del descongelamiento (3 etapas; tinción en 2 etapas; tinción en 1 etapa)

Toro 1 (TL) 0 horas después del descongelamiento	Células totales	Móvil (%)	Progres- ivamente móvil (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Control		(58.5)	(49.5)	93.5	81.0	161.5	7.0	26.0	86.5	52.5	
3 etapas (+ + +)		76	60	89.5	79.5	154.5	7.0	27.5	89.0	56.5	
tinción en 2 etapas (+ + -)		57	48	96.0	84.0	168.0	7.0	25.5	87.5	52.0	
tinción en 1 etapa (+ - -)		60.5	55	95.0	83.5	167.0	7.0	26.5	88.5	52.0	
Toro 2 (Jersey) 0 horas después del	Células totales	Móvil (%)	Progres- ivamente	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)

descongelamiento			móvil (%)								
Control		(79)	(68)	105.0	89.0	179.0	7.0	26.0	86.0	53.0	
3 etapas (+ + +)		70	57.7	94.5	82.0	165.5	6.5	30.0	86.5	52.0	
tinción en 2 etapas (+ + -)		74	67	97.0	85.0	170.0	7.0	27.0	88.0	52.0	
tinción en 1 etapa (+ - -)		80	71	104.0	88.0	189.0	8.0	26.0	85.0	49.0	

TABLA 9 (C) - Movilidad 3 horas después del descongelamiento (congelamiento de 1 etapa)

Toro 3			Progres-								
3 horas después del descongelamiento	Células totales	Móvil (%)	ivamente móvil (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)

Control	418	20	0	38	26	67	14	12			63
Control	238	29	0	35	23	53	0	14			59
Promedio - Control	656	(24.5)	(0)	36.5	24.5	60	7	13			61
congelamiento en 1 etapa (- - +)	384	50	10	43	35	80	5	17			63
congelamiento en 1 etapa (- - +)	385	59	17	48	40	86	5	19			83
congelamiento en 1 etapa (- - +)	210	32	4	41	31	75	6	13			67
congelamiento en 1 etapa (- - +)	301	45	11	45	33	81	6	13			85

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

Promedio - congelamiento en 1 etapa	1280	(46.5)	(10.5)	44.25	34.75	80.5	5.5	15.5			74.5
---	------	--------	--------	-------	-------	------	-----	------	--	--	------

Ejemplo 10

Se realizó un experimento adicional para evaluar la tasa de preñez de bovinos hembra inseminados con muestras de células espermáticas clasificadas tratadas con un antioxidante. Las muestras de semen de dos toros se clasificaron por sexo mediante el uso
5 del protocolo descrito anteriormente. Se agregó vitamina B12 en una concentración de 0.25 mg/ml a las muestras de prueba durante la etapa de tinción, la etapa de recolección (en el fluido de recepción del recipiente de recolección) y en la etapa de congelamiento (3 etapas).

Los tubillos de semen congelados que contenían muestras de células espermáticas clasificadas por sexo se descongelaron mediante el uso de procedimientos estándar. Se
10 calentó una pistola de inseminación artificial (AI) en la medida necesaria para que el recipiente alcanzara la temperatura corporal y se colocó un tubillo en el tambor de la pistola de inseminación. El extremo sellado del tubillo se cortó y se colocó una lámina de plástico sobre el tubillo y la pistola a efectos de higiene. Las hembras se colocaron previamente en una cabina de contención para la inseminación. La pistola se insertó a través de la vagina y
15 el cuello del útero y el semen se distribuyó en el cuerpo uterino. Se inseminaron 384 hembras, cada una de las cuales se inseminó con una única dosis de células espermáticas y cada dosis contenía 2.1 millones de células espermáticas en 0.25 ml. Los chequeos de preñez se realizaron a los 33 a 40 días después de la inseminación con una máquina de ultrasonido. Los resultados se muestran en la tabla 10 a continuación.

20

TABLA 10: Preñez (3 etapas)

		Inseminaciones	Porcentaje de preñez
Toro A	Control	87	32.8
	0.25mg/ml	100	35.6
Toro B	Control	99	30.9
	0.25mg/ml	98	27.0
Total/ Promedio	Control	186	(31.9)
Total/ Promedio	0.25mg/ml	198	(31.3)

Ejemplo 11

Se realizaron ensayos de campo de preñez adicionales mediante el uso de semen clasificado por sexo tratado con vitamina B12 a 0.25 mg/ml agregada a las muestras de prueba durante la etapa de tinción, durante la etapa de recolección y nuevamente en la etapa de congelamiento (3 etapas), como se realizó en el ejemplo 10, se evaluó otra vez mediante el uso de semen de cinco toros Holstein diferentes. Cada muestra de semen se dividió en grupos de control y de tratamiento con vitamina B12 (0.25 mg/ml) y después se inseminaron en vaquillas primiparas receptoras. Los chequeos de preñez se realizaron a los 33 a 40 días después de la inseminación mediante el uso de ultrasonido. Los resultados se muestran en la tabla 11 a continuación.

TABLA 11: Preñez (3 etapas)

	Antioxidante	Inseminaciones	Porcentaje de
--	--------------	----------------	---------------

			preñez
Toro A	Control		27.9
	0.25 mg/ml		28.4
Toro B	Control		26.1
	0.25 mg/ml		28.0
Toro C	Control		32.8
	0.25 mg/ml		35.6
Toro D	Control		26.0
	0.25 mg/ml		30.7
Toro E	Control		50.0
	0.25 mg/ml		57.0
Total/ Promedio	Control	499	(32.6)
Total/ Promedio	0.25 mg/ml	374	(35.9)

Ejemplo 12

También se analizaron los niveles de fragmentación de ADN mediante el uso de un kit de fragmentación de ADN ‘Halomax para animales’ (Halotech DNA, sl, Madrid, España) para determinar si había algún efecto ventajoso relacionado con el uso de antioxidantes durante la tinción y el procesamiento de esperma clasificado por sexo. Se examinaron dos razas diferentes de ganado, Jersey y Holstein, mediante el uso de dos

concentraciones diferentes de antioxidante, 0.25 mg/ml y 0.5 mg/ml de vitamina B12 con el protocolo de 3 etapas, mediante la adición de la misma concentración de OSR durante la tinción celular, en el líquido de recepción de la recolección y antes de la criopreservación.

Uno de los toros se utilizó para evaluar el efecto de la adición u omisión de OSR en una o
 5 más de las etapas de clasificación del espermatozoides. Se registró la movilidad y nivel de fragmentación de ADN. Los resultados se muestran en la tabla 12 a continuación.

TABLA 12: Fragmentación de ADN (tinción en 1 etapa, 2 etapas, 3 etapas)

	% de movilidad		% de fragmentación de ADN		
	0 horas	3 horas	0 horas	24 horas	48 horas
Toro A (Jersey)					
Control	57	17	1	1	1.7
0.25mg/ml	72	51	0.3	0.3	0.7
0.5mg/ml	60	42	0.3	0.7	1.3
Toro B (Holstein)					
Control	62	32	0.3	0.3	0.7
0.25mg/ml	67	32	0	0.3	0.3
0.5mg/ml	79	48	0.3	0.3	0.7

	% de movilidad		% de fragmentación de ADN		
Toro C (Jersey)	0 horas	3 horas	0 horas	24 horas	48 horas
Ensayo 1					
Control	79	72	1	1	1
3 etapas (+ + +)	70	75	0	0.3	0.3
tinción en 2 etapas (+ + -)	74	57	0.3	1	1
tinción en 1 etapa (+ - -)	80	47	0.7	1	1.3
Ensayo 2					
Control	59	12	0.3	1.7	1.7
3 etapas (+ + +)	76	42	0.3	0.3	0.7
tinción en 2 etapas (+ + -)	57	25	0.3	0.7	0.7

tinción en 1 etapa (+ - -)	61	37	0.7	1	1
-------------------------------	----	----	-----	---	---

Ejemplo 13

Se evaluó el efecto del OSR sobre la movilidad como una función de la concentración del esperma clasificado por sexo en el tubillo congelado. Las pruebas se

5 realizaron mediante el uso de vitamina B12 como el OSR en tres concentraciones diferentes de antioxidante: 0.15 mg/ml; 0.25 mg/ml y 0.35 mg/ml; todas se agregaron a las muestras de prueba durante la etapa de tinción, la etapa de recolección y nuevamente en la etapa de congelamiento (3 etapas), como se realizó en el ejemplo 8. Se evaluó el esperma de

10 Holstein a tres concentraciones de células espermáticas con base en la cantidad total de esperma por tubillo: 1 millón de esperma/tubillo; 2.1 de millones esperma/tubillo; y 5 millones de esperma/tubillo. Se registró la movilidad 3 horas después del descongelamiento.

También se evaluó una muestra de esperma de Jersey en la misma forma mediante el uso de 0.15 mg/ml o 0.25 mg/ml de vitamina B12 en cada una de las tres etapas (3

15 etapas), pero únicamente a una concentración de 2.1 millones de esperma/tubillo. Los resultados se muestran en la tabla 13.

TABLA 13: Concentración de células espermáticas congeladas (3 etapas)

(Holstein)	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	AL H	BCF	STR	LIN	PIA
1M/tubillo										
Control	20	4	40	32	76	3	15	78	42	43
.15mg/ml	48	18	48	42	81	4	12	88	53	66
.25 mg/ml	48	29	55	47	92	4	22	87	53	58
.35 mg/ml	65	46	58	51	94	4	23	88	55	70
2.1 M/tubillo										
Control	28	2	39	33	73	6	16	85	46	41
.15mg/ml	49	10	44	38	79	5	18	86	48	72
.25 mg/ml	48	18	46	40	81	5	20	87	50	76

.35 mg/ml	46	30	58	51	99	5	23	88	53	60
5M/tubillo										
Control	20	1	39	29	69	7	13	74	43	46
.25mg/ ml	24	2	41	28	69	7	14	70	42	68
.35mg/ ml	28	3	41	32	68	7	14	69	43	69
.5mg/ ml	14	3	43	30	71	6	15	70	43	50
(Jersey)										
2.1 M/tubillo										
Control	25	2	37	28	55	2	11	76	52	53
.15mg/ml	25	4	42	35	75	6	15	84	47	63
.25mg/ml	48	20	51	43	87	5	20	85	50	78

Ejemplo 14

Se evaluó el efecto de un OSR diferente sobre la movilidad del esperma bovino después de un período de 0 horas y 3 horas del descongelamiento. El OSR, α -tocoferilo, una forma de vitamina E, se compró como 'polioxietanil- α -tocoferilo sebacato' en una
5 solución concentrada al 15% (Aldrich). Las pruebas se realizaron mediante el uso de α -tocoferilo como el OSR a tres concentraciones diferentes: 0.01 mg/ml; 0.1 mg/ml y 0.5 mg/ml; todas se agregaron a las muestras de prueba durante la etapa de tinción, durante la etapa de recolección y nuevamente en la etapa de congelamiento (3 etapas), como se realizó en los ejemplos anteriores. El esperma de Holstein clasificado por sexo se evaluó mediante
10 el uso de una concentración de esperma estándar de 2.1 millones de esperma/tubillo procesado de tres toros diferentes. Se comparó la movilidad de las muestras tratadas con los controles sin tratar y se registró a las 0 horas y 3 horas después del descongelamiento.

TABLA 14: Movilidad con α -tocoferilo (vitamina E) (3 etapas)

	Células totales	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VS L	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Holstein 0 horas después del descongelamiento										
Toro A										
Control	548	56	25	75	52	151	7	22	74	39
0.01	617	72	17	100	49	201	10	20	56	27
0.1	458	73	33	99	62	217	9	22	66	32
0.5	424	63	36	97	68	214	9	22	72	34
Toro B										
Control	548	56	25	75	52	151	7	22	74	39

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

0.01	617	72	17	100	49	201	10	20	56	27
0.1	458	73	33	99	62	217	9	22	66	32
0.5	424	63	36	97	68	214	9	22	72	34
Toro C (1)										
Control	280	50	30	66	51	140	7	20	78	39
0.01	530	59	39	89	68	188	10	20	76	38
0.1	518	63	35	86	61	196	10	20	72	33
0.5	269	30	17	75	53	179	8	22	72	31
Toro C (2)										
Control	364	23	12	65	54	116	5	25	82	49
0.01	347	36	27	86	78	140	6	26	90	57
0.1	822	27	18	84	75	149	6	25	88	52

0.5	764	29	18	74	64	130	7	28	87	55
Holstein 3 horas después del descongelamiento										
A-toc	Células totales	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Toro A										
Control	260	25	6	39	33	71	5	16	83	47
0.01	253	64	20	51	42	92	5	21	84	49
0.1	297	62	32	54	46	101	5	22	86	48
0.5	235	54	29	60	51	106	5	24	85	49
Toro B										

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

Control	309	29	8	46	37	83	6	19	82	46
0.01	126	28	9	54	39	103	4	21	76	41
0.1	154	14	4	56	36	100	6	18	73	38
0.5	151	36	10	57	41	104	5	22	77	44
Toro C (1)										
Control	200	14	2	40	33	77	5	18	83	44
0.01	222	19	3	41	38	60	4	29	93	70
0.1	155	15	5	49	41	94	7	21	84	45
0.5	82	26	13	50	44	89	5	18	87	50
Toro C (2)										
Control	207	2	0	19	15	26	1	11	73	27
0.01	270	6	0	35	21	55	0	13	60	39

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

0.1	658	4	0	38	29	63	1	8	76	46
0.5	278	2	0	37	21	64	0	14	55	33

Ejemplo 15

Se evaluó el efecto de un tercer OSR sobre la movilidad del esperma bovino después de un período de 0 horas, 3 horas y seis horas del descongelamiento. Se preparó alfa-cetoglutarato (AKG) y se utilizó en tres concentraciones diferentes: 0.25 mg/ml; 0.35 mg/ml y 0.45 mg/ml; todas se agregaron a las muestras de prueba durante la etapa de tinción, durante la etapa de recolección y nuevamente en la etapa de congelamiento (3 etapas), como se realizó en los ejemplos anteriores. Se evaluó el esperma bovino de Holstein y Jersey clasificado por sexo mediante el uso de una concentración estándar de 2.1 M esperma/tubillo. Se comparó la movilidad de las muestras tratadas con los controles sin tratar a las 0 horas, 3 horas y 6 horas después del descongelamiento.

TABLA 15: Alfa-ceto Glutarato (AKG) (3 etapas)

Holstein - 0										
horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	
control	41	16	69	44	143	8	21	66	34	
.25 mg/ ml	91	75	104	81	185	8	27	82	48	
.35 mg/ ml	80	65	94	80	165	7	29	85	51	
.45 mg/ ml	86	75	98	88	162	7	30	89	57	

Holstein - 3										
horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
control	4	0	36	24	53	0	10	67	48	44
.25 mg/ ml	77	60	99	79	176	7	26	81	45	89
.35 mg/ ml	63	48	85	70	145	6	25	83	50	80

.45 mg/ ml	60	56	94	80	145	5	24	85	56	80
------------	----	----	----	----	-----	---	----	----	----	----

Holstein - 3										
horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
control	30	7	40	30	68	3	13	74	46	44
.25 mg/ ml	71	55	96	77	169	6	26	81	47	89
.35 mg/ ml	64	38	69	57	117	5	21	84	50	80
.45 mg/ ml	60	50	90	75	144	6	25	84	53	80

Holstein - 6										
horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
control	4	0	38	23	55	0	12	61	42	56
.25 mg/ ml	36	7	44	33	87	6	17	76	39	73

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

.35 mg/ ml	58	7	42	32	80	7	16	76	40	85
.45 mg/ ml	52	22	55	46	96	5	22	82	48	79

Holstein - 6 horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
control	4	0	38	23	55	0	12	61	42	56
.25 mg/ ml	36	7	44	33	87	6	17	76	39	73
.35 mg/ ml	58	7	42	32	80	7	16	76	40	85
.45 mg/ ml	52	22	55	46	96	5	22	82	48	79

Jersey - 0 horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
control	72	60	82	72	141	6	25	87	53
.25 mg/ ml	67	51	83	68	152	7	24	83	48
.35 mg/ ml	57	43	79	63	146	6	25	82	47

WO 2012/167151

PCT/US2012/040553

.45 mg/ ml	81	66	81	70	133	6	27	87	56
------------	----	----	----	----	-----	---	----	----	----

Jersey - 3 horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
control	13	1	36	24	65	2	14	66	38	42
.25 mg/ ml	33	16	65	49	117	5	24	79	46	62
.35 mg/ ml	26	10	59	46	110	6	25	80	45	54
.45 mg/ ml	59	25	67	50	66	6	25	78	45	71

Ejemplo 16

Se evaluó el efecto de la combinación de dos antioxidantes sobre la movilidad del esperma bovino después de un período de 0 horas, 3 horas y seis horas del descongelamiento. Se utilizó vitamina B12 a 0.25 mg/ml y alfa-cetoglutarato (AKG) recién
5 preparado a 0.35 mg/ml. La vitamina B12 o el AKG o ambos tratamientos se agregaron en las concentraciones designadas durante la etapa de tinción, durante la etapa de recolección y nuevamente en la etapa de congelamiento (3 etapas), como se realizó anteriormente. Se evaluó el esperma clasificado por sexo de tres toros Jersey mediante el uso de un estándar de 2.1 M esperma/tubillo. Se comparó la movilidad de las muestras tratadas con los
10 controles sin tratar a las 0 horas, 3 horas y 6 horas después del descongelamiento.

TABLA 16: AKG de combinación, vitamina B12 y combinación (3 etapas)

Jersey 1 - 0 horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Control	75	67	99	87	162	6	30	88	56
B12 - 0.25 mg/ml	88	78	97	87	157	6	33	89	58
AKG - 0.35 mg/ml	87	75	93	81	148	6	31	88	57
COMBO	78	69	93	83	149	6	32	89	57

Jersey 1 - 3 horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Control	43	5	41	33	74	6	15	56	46
B12 - 0.25 mg/ml	53	34	58	51	93	4	23	87	55
AKG - 0.35 mg/ml	60	44	82	67	136	5	27	83	50
COMBO	51	36	79	63	129	5	25	80	50

Jersey 1 - 6 horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BC F	ST R	LIN
Control	2	1	48	38	58	3	8	75	64
B12 - 0.25 mg/ml	37	2	38	28	61	4	15	73	48
AKG - 0.35 mg/ml	36	18	50	42	90	4	22	82	46
COMBO	35	6	45	34	81	5	17	76	43

Jersey 2 - 3 horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BC F	ST R	LIN
Control	18	1	35	22	57	5	13	61	38
B12 - 0.25 mg/ml	66	30	51	43	93	5	18	84	47
AKG - 0.35 mg/ml	64	50	78	62	117	5	19	82	56
COMBO	50	38	72	57	124	5	24	80	48

Jersey 2 - 6 horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BC F	ST R	LIN
Control	1	0	16	16	35	0	0	50	23
B12 - 0.25 mg/ml	24	1	36	24	51	1	17	65	47
AKG - 0.35 mg/ml	44	5	42	36	68	2	17	86	54
COMBO	46	18	61	46	111	5	21	77	44

Jersey 3 - 0 horas									
Control	80	60	100	80	186	8	26	81	46
B12 - 0.25 mg/ml	83	70	89	76	160	7	27	85	51
AKG - 0.35 mg/ml	86	73	95	82	170	7	27	85	50
COMBO	89	74	99	81	177	7	28	84	49

Jersey 3 - 3 horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	ST R	LI N
Control	64	22	47	38	88	6	16	81	45
B12 - 0.25 mg/ml	73	52	64	52	104	10	20	81	51
AKG - 0.35 mg/ml	80	44	69	53	118	6	19	79	47
COMBO	77	30	56	44	107	7	19	79	42

Jersey 3 - 6 horas	Móvil	Progresivamente móvil	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	ST R	LIN
Control	16	0.5	38	24	54	1	17	64	47
B12 - 0.25 mg/ml	44	1	37	24	56	3	14	66	44
AKG - 0.35 mg/ml	79	11	46	33	84	6	15	74	41
COMBO	72	12	49	34	98	8	16	71	35

Ejemplo 17

En un experimento adicional, se verificó la movilidad y movilidad progresiva del esperma de venado clasificado por sexo femenino o masculino a las 0, 1 y 3 horas después del descongelamiento de muestras de semen clasificadas por sexo que se trataron con el
5 antioxidante, vitamina B12 en dos concentraciones: 0.25 mg/ml y 0.35 mg/ml; todas las muestras se trataron durante la tinción, la recepción y antes de la criopreservación (3 etapas). No se agregó OSR a la muestra de control. Las muestras de semen provenían de dos ciervos de cola blanca. Cada muestra se clasificó en poblaciones de esperma enriquecidas por sexo masculino y femenino.

TABLA 17: Ciervo (macho y hembra) - vitamina B12 (3 etapas)

0 horas	HEMBR A	TOTA L	MÓVI L	Progresivamente móvil	VAP	VS L	VC L	AL H	BC F	STR
Ciervo A	CONTRO L	1887	74	53	85	67	157	7	24	78
	0.25	2803	82	53	83	62	157	7	24	74
	0.35	2484	84	55	92	68	169	7	24	74
	MACHO									
	CONTRO L	2939	81	55	94	70	178	7	24	76
	0.25	3036	76	49	91	66	173	7	24	73
	0.35	2448	86	54	98	71	181	8	24	73
Ciervo B	HEMBR A									
	CONTRO	2025	80	36	92	56	185	8	22	64

	L									
	0.25	1531	82	40	91	56	179	7	22	65
	0.35	1859	89	43	105	69	198	8	23	66
	MACHO									
	CONTRO L	2114	85	39	103	62	202	8	22	63
	0.25	1169	81	35	109	63	219	8	23	61
	0.35	1658	89	46	103	67	197	8	23	66

1 hora	HEMBR A	TOTA L	MÓVI L	Progresivamente móvil	VAP	VS L	VC L	AL H	BC F	STR
Ciervo A	CONTRO L	1286	64	29	86	57	170	8	21	68
	0.25	1380	78	41	97	64	185	8	21	67
	0.35	1808	80	31	109	68	216	9	22	63
	MACHO		MÓVI	Progresivamente	VAP	VS	VC	AL	BC	STR

			L	móvil		L	L	H	F	
	CONTRO L	1612	67	27	71	50	141	7	22	73
	0.25	1817	57	23	64	45	125	7	22	70
	0.35	3169	85	52	105	75	198	8	23	72
	HEMBR A		MÓVI L	Progresivamente móvil	VAP	VS L	VC L	AL H	BC F	STR
	CONTRO L	1371	81	26	65	43	127	6	19	68
	0.25	1541	83	28	84	51	158	8	19	64
	0.35	2637	92	32	116	66	214	9	20	58
	MACHO									
	CONTRO L	1520	84	48	86	57	169	6	23	70
	0.25	1086	84	46	104	66	203	8	22	67

Ciervo B

	0.35	1881	92	46	112	71	216	8	22	65
--	------	------	----	----	-----	----	-----	---	----	----

2 horas	HEMBR A	TOTAL	MOVI LIDAD	Progresivamente móvil	VAP	VS L	VC L	AL H	BC F	STR
Ciervo A	CONTRO L	1188	58	16	58	42	114	7	18	74
	0.25	1045	75	40	97	65	190	9	20	68
	0.35	877	54	19	68	50	137	8	20	75
	MACHO									
	CONTRO L	1325	59	13	51	38	101	6	19	77
	0.25	1523	56	24	66	46	130	6	22	70
	0.35	1797	58	39	101	75	193	8	23	76
Ciervo B	HEMBR A		MÓVI L	Progresivamente móvil	VAP	VS L	VC L	AL H	BC F	STR

	CONTRO L	1125	73	15	56	38	111	7	18	69
	0.25	834	64	11	53	36	106	7	16	68
	0.35	1378	85	26	100	57	190	8	19	60
	MACHO									
	CONTRO L	1603	77	37	66	46	126	6	19	73
	0.25	866	78	47	95	67	177	7	21	71
	0.35	1760	89	41	78	51	149	7	20	70

Como puede entenderse fácilmente de lo que antecede, los conceptos básicos de la presente invención pueden estar comprendidos en una variedad de formas. Como tal, las realizaciones particulares, elementos, términos o expresiones divulgadas en la descripción o mostrados en las figuras que acompañan a la presente solicitud no pretenden ser limitativos, sino ejemplos de las numerosas y variadas realizaciones comprendidas de forma general en la invención o sus equivalentes con respecto a cualquier elemento particular de estos. Asimismo, puede que la descripción específica de una única realización o elemento de la invención no describa explícitamente todas las realizaciones o elementos posibles; muchas alternativas se divulgan implícitamente en la descripción y figuras.

Debe entenderse que cada elemento de un aparato o cada etapa de un método pueden describirse por un término de aparato o un término de método. Dichos términos pueden sustituirse siempre que se desee para hacer explícito el alcance implícitamente amplio de la presente invención. Por ejemplo, debe entenderse que todas las etapas de un método pueden divulgarse como una acción, un medio para realizar dicha acción o un elemento que provoca dicha acción. De forma similar, cada elemento de un aparato puede divulgarse como un elemento físico o la acción que dicho elemento físico facilita. Como ejemplo adicional, debe entenderse que la divulgación de un “clasificador” abarca la divulgación del acto de “clasificar”, sea que se discuta explícitamente o no, y a la inversa, debe entenderse que la divulgación del acto de “clasificar” abarca la divulgación de un “clasificador”. Debe entenderse que dichos términos alternativos para cada elemento o etapa se encuentran incluidos explícitamente en la descripción.

Además, debe entenderse que a menos que la utilización del término específico en esta solicitud sea contradictoria con el uso e interpretación común de dicho término, debe entenderse que las definiciones de diccionario se encuentran incluidas en la descripción para cada término como se encuentran contenidas en el diccionario íntegro Random House Webster's, segunda edición, donde cada definición se incorpora en la presente a modo de referencia.

Asimismo, a los efectos de la presente invención, el término "un", "uno" o "una" antes de un elemento también se refiere a uno o más de dicho elemento; por ejemplo, "un recipiente" se refiere a uno o más recipientes. Como tal, los términos "un", "uno" o "una", "uno/a o más" y "al menos uno/a" pueden utilizarse de forma intercambiable en la presente. Además, como se utiliza en la presente el término "o" significa "y/o" a menos que se indique específicamente lo contrario.

La sección de antecedentes de la presente solicitud de patente proporciona una declaración del campo de emprendimiento al que pertenece la invención. Esta sección también puede incorporar o contener paráfrasis de ciertas patentes de Estados Unidos, solicitudes de patente, publicaciones o materia de la invención reivindicada útiles para relacionar información, problemas o preocupaciones con respecto al estado de la tecnología a la cual se refiere la invención. No se pretende que ninguna patente de Estados Unidos, solicitud de patente, publicación, declaración u otra información citada o incorporada en la presente se interprete o considere reconocida como técnica anterior con respecto a la presente invención y los términos utilizados en dichos documentos anteriores que pueden

utilizarse de forma similar en esta divulgación no alterarán la definición de los mismos términos como se define o desea en la presente.

Las reivindicaciones expuestas en la presente memoria descriptiva, si las hubiera, se incorporan en la presente a modo de referencia como parte de la descripción de la presente
5 invención y el solicitante se reserva expresamente el derecho de utilizar la totalidad o una parte de dichos contenidos incorporados como descripción adicional para dar apoyo a todas y cada una de las reivindicaciones o cualquiera de sus elementos o componentes. El solicitante asimismo se reserva expresamente el derecho de quitar cualquier porción o todos los contenidos incorporados de dichas reivindicaciones o cualquiera de sus elementos o
10 componentes de la descripción y colocarlo en las reivindicaciones o viceversa, según sea necesario para definir la invención para la cual se busca una protección con la presente solicitud o cualquier solicitud posterior o continuación, división o continuación en parte de la misma o para obtener cualquier beneficio para la reducción de costos en cumplimiento con las leyes, normas o regulaciones de patentes de cualquier país o tratado y dicho
15 contenido incorporado sobrevivirá a la totalidad del transcurso de la presente solicitud así como cualquier presentación de solicitud posterior, división, solicitud de continuación en parte o cualquiera de sus renovaciones o prórrogas.

Las reivindicaciones expresadas en la presente memoria descriptiva pretenden describir las medidas y límites de un número limitado de realizaciones preferidas de la
20 invención y no deben interpretarse como la realización más amplia de la invención o un listado completo de las realizaciones de la invención que pueden reivindicarse. El

solicitante no renuncia a ningún derecho de desarrollo de realizaciones adicionales con base en la descripción realizada anteriormente como parte de cualquier continuación, división o continuación en parte o solicitud similar.

5 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

Reivindicaciones:

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Un método para tratar células espermáticas durante el procesamiento para
5 mejorar la integridad celular que comprende las siguientes etapas:
 - a. proporcionar una muestra de célula espermática;
 - b. procesar la muestra de célula espermática; y
 - c. agregar uno o más OSR en un intervalo de concentración de 0.01 mg/ml a 5
mg/ml a una muestra de célula espermática para formar una composición de
10 células espermáticas.
2. El método como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende además
la etapa de mantener la composición de células espermáticas a una temperatura de
mantenimiento sin congelarla durante un período de tiempo en el intervalo de
aproximadamente 2 segundos a aproximadamente una semana después de la adición de uno
15 o más OSR.
3. El método como se reivindica en la reivindicación 2, donde el período de
espera se selecciona de un intervalo que se selecciona del grupo de: aproximadamente 2
segundos a aproximadamente 3 minutos; de aproximadamente 3 minutos a
aproximadamente 15 minutos; de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 1 hora;
20 de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 8 horas; de aproximadamente 8 horas a
aproximadamente 12 horas; de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 18 horas; de

aproximadamente 8 horas a aproximadamente 24 horas; de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas; de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas; de aproximadamente 72 horas a aproximadamente 96 horas; de aproximadamente 96 horas a aproximadamente 120 horas; de aproximadamente 120 horas a aproximadamente 144 horas
5 y de aproximadamente 144 horas a aproximadamente 168 horas.

4. El método de la reivindicación 2, donde la temperatura de mantenimiento se encuentra en el intervalo de 4°C y 39°C.

5. El método de la reivindicación 4, donde la temperatura de mantenimiento se encuentra en el intervalo de aproximadamente 4°C a 16°C.

10 6. Un método para transportar células espermáticas procesadas que comprende las siguientes etapas:

a. formar una composición de células espermáticas de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y

b. transportar la composición de células espermáticas a una segunda ubicación.

15 7. El método como se reivindica en la reivindicación 1, donde el procesamiento de la muestra de célula espermática comprende dos o más etapas de procesamiento que se seleccionan del grupo de: recolección de una muestra de semen; mantenimiento; transporte; tamponación; enfriamiento; calentamiento; tinción; dilución; concentración; excitación con láser; carga electrónica; deflexión; ablación; clasificación;
20 recolección; agitación; oscilación; separación magnética; oxigenación; marcación; precipitación; centrifugación; resuspensión; mezcla; diálisis; crioestabilización;

congelamiento; descongelamiento; vitrificación; cultivo; inseminación; microinyección; procesamiento microfluídico; procesamiento con microchip; procesamiento a chorro y con aire; procesamiento de citometría de flujo; y técnicas de manejo similares.

8. El método como se reivindica en la reivindicación 1, donde el
5 procesamiento comprende un procedimiento de clasificación de espermatozoides de múltiples etapas que da como resultado la recolección de una o más subpoblaciones de células espermáticas enriquecidas.

9. El método como se reivindica en la reivindicación 8, donde el procedimiento de clasificación incluye la etapa de teñir el espermatozoides con tinte selectivo para el ADN.

10 10. El método como se reivindica en la reivindicación 8, donde las subpoblaciones comprenden al menos una subpoblación de células espermáticas enriquecida por sexo.

11. El método como se reivindica en la reivindicación 8, donde el procedimiento de clasificación incluye al menos una etapa de procesamiento a una temperatura que se
15 selecciona del grupo que consiste en: 5°C a 15°C; 15°C a 20°C; 20°C a 25°C; 25°C a 30°C; 30°C a 35°C; 35°C a 40°C y 40°C a 45°C.

12. El método como se reivindica en la reivindicación 8, donde el procedimiento de clasificación comprende la etapa de agregar un diluyente a la muestra de célula espermática o a la composición de células espermáticas, donde el pH del diluyente se
20 encuentra en el intervalo de pH 5.5 a pH 7.8.

13. El método como se reivindica en la reivindicación 12, donde el pH se selecciona del grupo de: aproximadamente 5.5; aproximadamente 5.6; aproximadamente 5.7; aproximadamente 5.8; aproximadamente 5.9; aproximadamente 6.0; aproximadamente 6.1; aproximadamente 6.2; aproximadamente 6.3; aproximadamente 6.4; aproximadamente 6.5; aproximadamente 6.6; aproximadamente 6.7; aproximadamente 6.8; aproximadamente 6.9; aproximadamente 7.0; aproximadamente 7.1; aproximadamente 7.2; aproximadamente 7.3; aproximadamente 7.4; aproximadamente 7.5; aproximadamente 7.6; aproximadamente 7.7 y aproximadamente 7.8.

14. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la muestra de célula espermática se congeló y se descongeló antes de su procesamiento adicional.

15. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el método comprende además la etapa de congelar la composición de células espermáticas para formar una composición de células espermáticas congelada.

16. El método como se reivindica en la reivindicación 15, donde el método comprende además la etapa de descongelar la composición de células espermáticas congelada.

17. Un método para producir un embrión que comprende: formar una composición de células espermáticas como se reivindica en la reivindicación 1 y utilizar la composición de células espermáticas para técnicas de reproducción asistida.

18. El método para producir un embrión de conformidad con el método de la reivindicación 17, donde la técnica de reproducción asistida (ART) se selecciona del grupo que consiste en: fecundación *in vitro* (IVF), inseminación artificial (AI), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), ovulación múltiple y transferencia de
5 embriones (MOET) así como otras técnicas de transferencia de embriones.

19. El método para producir un embrión de conformidad con el método de la reivindicación 17, donde la técnica de reproducción asistida es la fecundación *in vitro* (IVF) u ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET).

20. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19,
10 donde los OSR se seleccionan del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA),
15 dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

21. El método como se reivindica en la reivindicación 20, donde los OSR se seleccionan del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

22. El método como se reivindica en la reivindicación 20, donde los uno o más
20 OSR se agregan a la composición de células espermáticas en cualquier etapa dada por la

cual el OSR agregado se agrega para encontrarse en el intervalo de 0.01 a 5.0 mg/ml en la composición de células espermáticas.

23. El método como se reivindica en la reivindicación 21, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: 0.01 a 5.0 mg/ml; 0.01 a 0.25
5 mg/ml; 0.01 a 0.5 mg/ml; 0.01 a 1 mg/ml; 0.01 a 2.5 mg/ml; 0.01 a 5 mg/ml; 0.05 a 0.1 mg/ml; 0.05 a 1.0 mg/ml; 0.05 a 2.5 mg/ml; 0.1 a 0.25 mg/ml; 0.1 a 0.5 mg/ml; 0.1 a 1 mg/ml; 0.1 a 2.5 mg/ml; 0.1 a 5 mg/ml; 0.15 a 0.45 mg/ml; 0.15 a 0.5 mg/ml; 0.25 a 0.35 mg/ml; 0.25 a 0.5 mg/ml; 0.25 a 1 mg/ml; 0.25 a 2.5 mg/ml; 0.25 a 5 mg/ml; 0.35 a 0.5 mg/ml; 0.35 a 1 mg/ml; 0.35 a 2.5 mg/ml; 0.35 a 5 mg/ml; 0.5 a 1 mg/ml; 0.5 a 2.5 mg/ml;
10 0.5 a 5 mg/ml; 1 a 2.5 mg/ml y 1 a 5 mg/ml.

24. El método como se reivindica en la reivindicación 23, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente
15 0.5 mg/ml.

25. El método como se reivindica en la reivindicación 24, donde la concentración del OSR agregado es de aproximadamente 0.15 mg/ml, aproximadamente 0.25 mg/ml o aproximadamente 0.35 mg/ml.

26. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25,
20 donde el procesamiento constituye dos o más etapas de procesamiento y donde el OSR se agrega en una o más etapas de procesamiento.

27. Un medio de reducción de tensión que comprende al menos un OSR en una concentración adecuada de solución madre presente en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml en la composición de células espermáticas en el momento del procesamiento.

28. Un medio de reducción de tensión como se reivindica en la reivindicación 5 27, para clasificar las células espermáticas que comprende uno o más de los siguientes tampones que se seleccionan del grupo de: Tris, TES, HEPES, TALP, TCA, PBS, citrato, leche y sus derivados.

29. El medio de reducción de tensión para clasificar el esperma como se reivindica en la reivindicación 27 o 28, donde el OSR se selecciona del grupo que 10 comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados 15 biológicamente activos.

30. El medio de reducción de tensión para clasificar el esperma como se reivindica en la reivindicación 29, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

20 31. Un método para clasificar una muestra de célula espermática para formar una o más subpoblaciones que comprenden las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra de célula espermática;
- b. clasificar la muestra de célula espermática para formar una o más subpoblaciones; y
- c. agregar al menos un OSR a la muestra de célula espermática, durante una o
5 más de las etapas de procesamiento, donde la concentración del OSR agregado a la muestra de célula espermática se encuentra en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml.

32. El método como se reivindica en la reivindicación 31, donde el método comprende además una etapa de tinción de la muestra de célula espermática con un tinte
10 selectivo para el ADN para formar una muestra de célula espermática teñida.

33. El método como se reivindica en la reivindicación 31 o 32, donde la una o más subpoblaciones comprenden al menos una población enriquecida por sexo de células espermáticas que presentan el cromosoma X o que presentan el cromosoma Y que tienen un tinte selectivo para el ADN asociado con su ADN.

34. El método como se reivindica en la reivindicación 31, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de
15 vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -
20 tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

35. El método como se reivindica en la reivindicación 34, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

5 36. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35, donde el método comprende además la etapa de congelar la una o más subpoblaciones.

37. El método como se reivindica en la reivindicación 36, donde el método comprende además la etapa de descongelar la población enriquecida por sexo congelada de células espermáticas que presentan el cromosoma X o que presentan el cromosoma Y y
10 utilizarla para ART.

38. El método como se reivindica en la reivindicación 31, donde el método comprende además la etapa de dejar que transcurra un período de tiempo después de la adición del antioxidante, el período de tiempo se encuentra en el intervalo de aproximadamente 3 segundos a aproximadamente 72 horas.

15 39. El método como se reivindica en la reivindicación 38, donde el período de tiempo se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 3 segundos a aproximadamente 3 horas; de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 6 horas; de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas; de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 18 horas; de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 24 horas; de
20 aproximadamente 24 horas a aproximadamente 36 horas; de aproximadamente 36 horas a

aproximadamente 48 horas; de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 60 horas y de aproximadamente 60 horas a aproximadamente 72 horas.

40. El método de la reivindicación 39, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la muestra de célula
5 espermiática.

41. El método como se reivindica en la reivindicación 31, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente
10 0.5 mg/ml.

42. El método como se reivindica en la reivindicación 31, donde el método comprende además la etapa de agregar un tampón, un medio y/o un diluyente a una muestra de célula espermiática donde el tampón, el medio y/o el diluyente se encuentran en un intervalo de pH de 6.5 a 7.5.

43. El método como se reivindica en la reivindicación 42, donde el pH se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 6.5; aproximadamente 6.6; aproximadamente 6.7; aproximadamente 6.8; aproximadamente 6.9; aproximadamente 7.0; aproximadamente 7.1; aproximadamente 7.2; aproximadamente 7.3; aproximadamente 7.4 y aproximadamente 7.5.

44. El método como se reivindica en la reivindicación 31, donde al menos una de las etapas de procesamiento se lleva a cabo dentro de un intervalo de temperatura que se

selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 5°C a aproximadamente 15°C; aproximadamente 15°C a aproximadamente 20°C; aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C; aproximadamente 25°C a aproximadamente 30°C; aproximadamente 30°C a aproximadamente 35°C; aproximadamente 35°C a
5 aproximadamente 40°C y aproximadamente 40°C a aproximadamente 45°C.

45. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 31 a 44, donde la muestra de célula espermática es una muestra de célula espermática congelada que se descongeló.

46. Un método para clasificar una muestra de célula espermática que comprende
10 las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra de célula espermática;
- b. teñir la muestra de célula espermática con un primer medio;
- c. clasificar la muestra de célula espermática para formar al menos una subpoblación contenida en un segundo medio; y
- 15 d. congelar la al menos una subpoblación en un tercer medio;

donde al menos uno del primer medio, el segundo medio o el tercer medio contiene al menos un OSR a una concentración de procesamiento final en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml.

47. El método de la reivindicación 46, donde el OSR se selecciona del grupo
20 que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas,

vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados), tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

5 48. El método como se reivindica en la reivindicación 47, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

10 49. El método de la reivindicación 47, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la muestra de célula espermática.

15 50. El método de la reivindicación 49, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

 51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 46 a 50, donde el al menos un OSR se agrega a: el primer medio o el segundo medio o el tercer medio.

20 52. El método de cualquiera de las reivindicaciones 46 a 50, donde el al menos un OSR se agrega a: el primer medio y el segundo medio o el primer medio y el tercer medio o el segundo y el tercer medio.

53. El método de cualquiera de las reivindicaciones 46 a 50, donde el al menos un OSR se agrega a: el primer medio y el segundo medio y el tercer medio.

54. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 o 31 a 53, donde la muestra de célula espermática deriva de un humano, bovino, porcino, ovino, equino, ciervo,
5 alce, búfalo, canino, felino, chimpancé, gorila, ballena, delfín y otros mamíferos marinos.

55. Un método para clasificar una muestra de célula espermática que comprende las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra de célula espermática;
- b. teñir la muestra de célula espermática con un primer medio; y
- 10 c. clasificar la muestra de célula espermática para formar al menos una subpoblación contenida en un segundo medio;

donde al menos uno del primer medio o el segundo medio contiene al menos un OSR con una concentración de procesamiento final en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml.

15 56. El método de la reivindicación 55, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato
20 (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

57. El método como se reivindica en la reivindicación 56, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

5 58. El método de la reivindicación 56, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la muestra de célula espermática.

59. El método de la reivindicación 56, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1
10 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

60. El método de cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, donde el al menos un OSR se agrega al primer medio o al segundo medio.

61. El método de cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, donde el al menos
15 un OSR se agrega al primer medio y al segundo medio.

62. El método de cualquiera de las reivindicaciones 55 a 61, donde la muestra de célula espermática deriva de un humano, bovino, porcino, ovino, equino, ciervo, alce, búfalo, canino, felino, chimpancé, gorila, ballena, delfín y otros mamíferos marinos.

63. Una muestra de esperma procesada que comprende una muestra de célula
20 espermática que se sometió a una o más etapas de procesamiento y que contiene uno o más OSR en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml.

64. La muestra de esperma procesada como se reivindica en la reivindicación 63, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA) y dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

65. La muestra de esperma procesada como se reivindica en la reivindicación 64, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

66. La muestra de esperma procesada de cualquiera de las reivindicaciones 63 a 65, donde la muestra de célula espermática se clasificó.

67. La muestra de esperma procesada de la reivindicación 66, donde la muestra de célula espermática se clasificó por sexo.

68. La muestra de esperma procesada de cualquiera de las reivindicaciones 63 a 67, donde la muestra de célula espermática se encuentra descongelada.

69. La muestra de esperma procesada de cualquiera de las reivindicaciones 63 a 67, donde la muestra de célula espermática se encuentra congelada.

70. La muestra de esperma procesada de cualquiera de las reivindicaciones 63 a 69, donde la muestra de célula espermática deriva de un humano, bovino, porcino, ovino,

equino, ciervo, alce, búfalo, canino, felino, chimpancé, gorila, ballena, delfín y otros mamíferos marinos.

71. Un método para fecundar uno o más huevos que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. colocar una muestra de célula espermática en un medio para preparar una composición de células espermáticas, donde el medio contiene uno o más OSR que tienen una concentración adecuada para preparar una composición de células espermáticas que presente una concentración de OSR en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml; y
- 10 b. mezclar el uno o más huevos con la muestra de célula espermática para formar una composición de células espermáticas.

72. El método de la reivindicación 71, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas,
15 vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

73. El método como se reivindica en la reivindicación 72, donde el OSR se
20 selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina

E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

74. El método de la reivindicación 72, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la composición de células
5 espermáticas.

75. El método de la reivindicación 72, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

10 76. El método de cualquiera de las reivindicaciones 71 a 75, donde la composición de células espermáticas se clasificó.

77. El método de la reivindicación 76, donde la composición de células espermáticas se clasificó por sexo.

78. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, 15 a 26, 31 a 44, 46
15 a 54 o 71 a 77, donde la muestra de célula espermática se encuentra descongelada.

79. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26, 46 a 54, 55 a 62 o 71 a 77, donde la muestra de célula espermática se encuentra congelada.

80. El método de cualquiera de las reivindicaciones 71 a 77, donde la muestra de célula espermática deriva de un humano, bovino, porcino, ovino, equino, ciervo, alce,
20 búfalo, canino, felino, chimpancé, gorila, ballena, delfín y otros mamíferos marinos.

81. Un embrión producido mediante el método que comprende las siguientes etapas:

- a. colocar una muestra de célula espermática en un medio, donde el medio contiene al menos un OSR que tiene una concentración en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml; y
- b. mezclar el uno o más huevos con la muestra de célula espermática para producir un embrión.

82. El embrión como se reivindica en la reivindicación 81, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados), tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

83. El embrión como se reivindica en la reivindicación 82, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

84. El embrión de la reivindicación 81, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la muestra de célula espermática.

85. El embrión de la reivindicación 81, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

5 86. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 81 a 85, donde la muestra de célula espermática se clasificó.

87. El embrión de la reivindicación 86, donde la muestra de célula espermática se clasificó por sexo.

88. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 81 a 87, donde la muestra
10 de célula espermática se encuentra descongelada.

89. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 81 a 87, donde la muestra de célula espermática se encuentra congelada.

90. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 81 a 89, donde la muestra de célula espermática deriva de un humano, bovino, porcino, ovino, equino, ciervo, alce,
15 búfalo, canino, felino, chimpancé, gorila, ballena, delfín y otros mamíferos marinos.

91. Un método para fecundar uno o más huevos que comprende las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra de célula espermática;
- b. agregar un primer medio;
- 20 c. teñir la muestra de célula espermática en el primer medio;

- d. clasificar la muestra de célula espermática para formar una o más subpoblaciones de células espermáticas;
 - e. recolectar la subpoblación de células espermáticas en un segundo medio;
 - f. mezclar la subpoblación de células espermáticas con uno o más huevos para
- 5 fecundar uno o más de los huevos;

donde el primer medio y/o el segundo medio contiene al menos un OSR en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y donde el medio que contiene OSR puede prepararse antes de la adición a la muestra de célula espermática o mediante la adición de una solución concentrada de OSR a la solución de muestra de célula espermática.

- 10 92. Un método para fecundar uno o más huevos que comprende las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra de célula espermática;
- b. agregar un primer medio;
- c. teñir la muestra de célula espermática en el primer medio;
- 15 d. clasificar la muestra de célula espermática para formar una o más subpoblaciones de células espermáticas;
- e. recolectar la subpoblación de células espermáticas en un segundo medio;
- f. congelar la subpoblación de células espermáticas en un tercer medio;
- g. descongelar la subpoblación de células espermáticas; y
- 20 h. mezclar la subpoblación de células espermáticas descongelada con uno o más huevos para fecundar uno o más de los huevos;

donde al menos uno del primer medio, el segundo medio o el tercer medio contiene al menos un OSR que tiene una concentración en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y donde el medio que contiene OSR puede prepararse antes de la adición a la muestra de célula espermática o mediante la adición de una solución concentrada de OSR a la solución de muestra de célula espermática.

93. El método como se reivindica en la reivindicación 91 o 92, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

94. El método como se reivindica en la reivindicación 93, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

95. El método de la reivindicación 93, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la composición de células espermáticas.

96. El método de la reivindicación 93, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1

mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

97. El método de cualquiera de las reivindicaciones 91 a 96, donde la muestra de célula espermática se encuentra descongelada.

5 98. El método de cualquiera de las reivindicaciones 91 a 96, donde la muestra de célula espermática se encuentra congelada.

99. El método de cualquiera de las reivindicaciones 91 a 98, donde la muestra de célula espermática deriva de un humano, bovino, porcino, ovino, equino, ciervo, alce, búfalo, canino, felino, chimpancé, gorila, ballena, delfín y otros mamíferos marinos.

10 100. El método de cualquiera de las reivindicaciones 71 a 80 o 91 a 99, donde los huevos se cultivaron en un medio de maduración.

101. El método de la reivindicación 100, donde el medio de maduración comprende FBS, piruvato, gonadotropina coriónica, FSH, estradiol y al menos un antibiótico.

15 102. El método de la reivindicación 101, donde el medio de maduración también comprende TCM-199.

103. El método de la reivindicación 102, donde el huevo se cultivó en un medio de maduración que comprende TCM-199, FBS, piruvato, gonadotropina coriónica, FSH, estradiol y al menos un antibiótico en una relación aproximada de

20 9:1:0.02:0.1:0.01:0.01:0.02 en volumen, respectivamente.

104. Un embrión clasificado producido mediante el método que comprende:

- a. proporcionar una muestra de célula espermática;
- b. agregar un primer medio;
- c. teñir la muestra de célula espermática en el primer medio;
- d. clasificar la muestra de célula espermática para formar una o más subpoblaciones de células espermáticas;
- e. recolectar la subpoblación de células espermáticas en un segundo medio; y
- f. mezclar la subpoblación de células espermáticas con uno o más huevos para producir uno o más embriones;

donde el primer medio y/o el segundo medio contiene al menos un OSR en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y donde el medio que contiene OSR puede prepararse antes de la adición a la muestra de célula espermática o mediante la adición de una solución concentrada de OSR a la solución de muestra de célula espermática.

105. Un embrión clasificado producido mediante el método que comprende las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra de célula espermática;
- b. agregar un primer medio;
- c. teñir la muestra de célula espermática con un primer medio;
- d. clasificar la muestra de célula espermática para formar al menos una subpoblación de células espermáticas;
- e. recolectar la subpoblación de células espermáticas en un segundo medio;
- f. congelar la subpoblación en un tercer medio;

- g. descongelar la subpoblación; y
- h. mezclar la subpoblación de células espermáticas con uno o más huevos para producir uno o más embriones,

donde al menos uno del primer medio, el segundo medio o el tercer medio contiene
5 al menos un OSR que tiene una concentración en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y
donde el medio que contiene OSR puede prepararse antes de la adición a la muestra de
célula espermática o mediante la adición de una solución concentrada de OSR a la solución
de muestra de célula espermática.

106. El embrión como se reivindica en la reivindicación 104 o 105, donde el OSR
10 se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión,
glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico,
flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de
vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -
tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica
15 (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

107. El embrión como se reivindica en la reivindicación 106, donde el OSR se
selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina
E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus
derivados.

108. El embrión de la reivindicación 106, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la muestra de célula espermática.

109. El embrión de la reivindicación 106, donde la concentración del OSR
5 agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

110. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 104 a 109, donde la muestra de célula espermática se encuentra descongelada.

10 111. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 104 a 109, donde la muestra de célula espermática se encuentra congelada.

112. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 104 a 111, donde la muestra de célula espermática deriva de un humano, bovino, porcino, ovino, equino, ciervo, alce, búfalo, canino, felino, chimpancé, gorila, ballena, delfín y otros mamíferos marinos.

15 113. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 104 a 112, donde el huevo se cultivó en un medio de maduración.

114. El embrión de la reivindicación 113, donde el medio de maduración comprende FBS, piruvato, gonadotropina coriónica, FSH, estradiol y al menos un antibiótico.

20 115. El embrión de la reivindicación 114, donde el medio de maduración también comprende TCM-199.

116. El embrión de la reivindicación 115, donde el huevo se cultivó en un medio de maduración que comprende TCM-199, FBS, piruvato, gonadotropina coriónica, FSH, estradiol y al menos un antibiótico en una relación aproximada de 9:1:0.02:0.1:0.01:0.01:0.02 en volumen, respectivamente.

5 117. Una composición de células espermáticas que comprende:

a. una muestra de célula espermática; y

b. al menos un OSR que tiene una concentración en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml.

118. La composición de células espermáticas de la reivindicación 117, donde la
10 muestra de célula espermática se clasificó.

119. La composición de células espermáticas de la reivindicación 117 o 118, que también comprende un tinte.

120. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 117 a 119, que también comprende un diluyente o un medio.

15 121. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 117 a 120 que también comprende un crioprotector.

122. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 117 a 121, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros
20 relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros

relacionados), tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

123. La composición de células espermáticas de la reivindicación 122, donde el
5 OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

124. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 122 a 123, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el
10 intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la muestra de célula espermática.

125. La composición de células espermáticas de la reivindicación 124, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente
15 0.5 mg/ml.

126. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 117 a 125, donde la muestra de célula espermática se encuentra descongelada.

127. La composición de células espermáticas de cualquiera de las
20 reivindicaciones 117 a 125, donde la muestra de célula espermática se encuentra congelada.

128. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 117 a 127, donde la muestra de célula espermática deriva de un humano, bovino, porcino, ovino, equino, ciervo, alce, búfalo, canino, felino, chimpancé, gorila, ballena, delfín y otros mamíferos marinos.

5 129. Un medio de maduración para ART, que comprende FBS, piruvato, gonadotropina coriónica, FSH, estradiol y al menos un antibiótico.

130. El medio de maduración de la reivindicación 129, que también comprende TCM-199.

10 131. El medio de maduración de la reivindicación 130, que comprende TCM-199, FSH, gonadotropina coriónica, estradiol, piruvato y al menos un antibiótico en una relación aproximada de 9:1:0.02:0.1:0.01:0.01:0.02 en volumen, respectivamente.

132. La muestra de espermia procesada como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 63 a 70 que se encuentra congelada.

15 133. El embrión como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 81 a 90 o 104 a 116 que se encuentra congelado o vitrificado.

134. La composición de células espermáticas como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 117 a 128 que se encuentra congelada.

20 135. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde la muestra de célula espermática se congeló y descongeló antes del procesamiento adicional, se sometió a un procedimiento de clasificación de múltiples etapas y se utilizó directamente en ART sin congelamiento.

136. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde la muestra de célula espermática se congeló y descongeló antes del procesamiento adicional, se sometió a un procedimiento de clasificación de múltiples etapas y se congeló.

5 137. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde la muestra de célula espermática se descongeló, se sometió a un procedimiento de clasificación de múltiples etapas y se utilizó directamente en ART sin congelamiento.

10 138. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde la muestra de célula espermática se descongeló, se sometió a un procedimiento de clasificación de múltiples etapas y se congeló.

139. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde uno o más OSR se agregan en la etapa de tinción.

15 140. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde uno o más OSR se agregan en la etapa de recolección después de la clasificación.

141. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde uno o más OSR se agregan en la etapa de preparación criogénica antes del congelamiento.

142. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde uno o más OSR se agregan en la etapa de tinción y en la etapa de recolección.

143. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16,
5 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde uno o más OSR se agregan en la etapa de recolección y en la etapa de preparación criogénica antes del congelamiento.

144. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde uno o más OSR se agregan en la etapa de tinción, en la etapa de recolección y en la etapa de preparación criogénica antes del congelamiento.

10 145. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 139 a 144 donde al menos un OSR es un vitámero de vitamina B12 y se agrega con una concentración de 0.25 mg/ml en la suspensión de células espermáticas.

146. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 139 a 144 donde al menos un OSR es un vitámero de vitamina B12 y se agrega con una
15 concentración en el intervalo de 0.15 mg/ml a 0.5 mg/ml en la suspensión de células espermáticas.

147. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 139 a 144 donde al menos un OSR es un vitámero de vitamina E y se agrega con una concentración en el intervalo de 0.15 mg/ml a 0.5 mg/ml en la suspensión de células
20 espermáticas.

148. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 139 a 144 donde al menos un OSR es una forma activa de AKG y se agrega con una concentración en el intervalo de 0.15 mg/ml a 0.5 mg/ml en la suspensión de células espermáticas.

5 149. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 139 a 144, donde dos OSR se utilizan en combinación y se seleccionan del grupo que comprende: un vitámero de vitamina B12 agregado con una concentración en el intervalo de 0.15 mg/ml a 0.5 mg/ml, un vitámero de vitamina E agregado a una concentración en el intervalo de 0.15 mg/ml a 0.5 mg/ml y un derivado activo de AKG con una concentración
10 en el intervalo de 0.15 mg/ml a 0.5 mg/ml en la suspensión de células espermáticas.

150. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, 31 a 62, 71 a 80 o 91 a 103, donde la muestra de célula espermática contiene células muertas indeseadas.

151. El método como se reivindica en la reivindicación 150, donde la muestra de
15 célula espermática se extrae manualmente para matar los tipos celulares indeseados dentro de la muestra de célula espermática.

RESUMEN

La invención se refiere de forma general a composiciones y métodos para el manejo de poblaciones de esperma procesado que incluyen muestras recién extraídas, las que se transportan como muestras recién extraídas, así como las muestras que se congelan y
5 descongelan, las que se clasifican en una o más subpoblaciones y las que de otro modo se procesan o manejan de forma tal que ejercen un trauma sobre la célula espermática. Dicho trauma puede reducir la movilidad, fecundidad, viabilidad e integridad global del esperma y reducir la capacidad del esperma de fecundar un huevo, crecer como un embrión saludable y producir una cría sana. La presente invención se refiere a compuestos nuevos que pueden
10 agregarse a la muestra de célula espermática para reducir los efectos traumáticos de la tensión física durante el procesamiento de células espermáticas moderado así como exhaustivo, métodos para utilizar los compuestos en procedimientos de procesamiento de esperma estándar, los productos finales preparados a partir de estos métodos que incluyen esperma y embriones así como los métodos para utilizar dichos productos finales en
15 técnicas biológicas de reproducción asistida en animales.

Reivindicaciones:

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

- 5 **1.** Un medio de reducción de tensión que comprende al menos un OSR en una concentración adecuada de solución madre presente en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml en la composición de células espermáticas en el momento del procesamiento.
- 10 **2.** Un medio de reducción de tensión como se reivindica en la reivindicación 1, para clasificar las células espermáticas que comprende uno o más de los siguientes tampones que se seleccionan del grupo de: Tris, TES, HEPES, TALP, TCA, PBS, citrato, leche y sus derivados.
- 15 **3.** El medio de reducción de tensión para clasificar el espermatozoide como se reivindica en la reivindicación 1 o 2, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG),
20 malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

4. El medio de reducción de tensión para clasificar el esperma como se reivindica en la reivindicación 3, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.
5. Un método para fecundar uno o más huevos que comprende las siguientes etapas:
- a. colocar una muestra de célula espermática en un medio para preparar una composición de células espermáticas, donde el medio contiene uno o más OSR que tienen una concentración adecuada para preparar una composición de células espermáticas que presente una concentración de OSR en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml; y
 - b. mezclar el uno o más huevos con la muestra de célula espermática para formar una composición de células espermáticas.
6. El método de la reivindicación 5, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG),

malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

7. El método como se reivindica en la reivindicación 6, donde el OSR se selecciona del grupo
5 que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

8. El método de la reivindicación 6, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la composición de células espermáticas.

10

9. El método de la reivindicación 6, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

15

10. El método de la reivindicación 5-9, donde la composición de células espermáticas se clasificó por sexo.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-9, donde la muestra de célula
20 espermática se encuentra descongelada.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-9 donde la muestra de célula espermática se encuentra congelada.

13. Un embrión producido mediante el método que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. colocar una muestra de célula espermática en un medio, donde el medio contiene al menos un OSR que tiene una concentración en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml; y
- b. mezclar el uno o más huevos con la muestra de célula espermática para producir un embrión.

10

14. Un método para fecundar uno o más huevos que comprende las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra de célula espermática;
- b. agregar un primer medio;
- c. teñir la muestra de célula espermática en el primer medio;
- 15 d. clasificar la muestra de célula espermática para formar una o más subpoblaciones de células espermáticas;
- e. recolectar la subpoblación de células espermáticas en un segundo medio;
- f. congelar la subpoblación de células espermáticas en un tercer medio;
- g. descongelar la subpoblación de células espermáticas; y
- 20 h. mezclar la subpoblación de células espermáticas descongelada con uno o más huevos para fecundar uno o más de los huevos;

Donde al menos uno del primer medio, el segundo medio o el tercer medio contiene al menos un OSR que tiene una concentración en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y donde el medio que contiene OSR puede prepararse antes de la adición a la muestra de célula espermática o mediante la adición de una solución concentrada de OSR a la solución de muestra de célula espermática.

15 16. El método como se reivindica en la reivindicación 13 o 14, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

15 16. El método como se reivindica en la reivindicación 15, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

20 17. El método de la reivindicación 15, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la composición de células espermáticas.

18. El método de la reivindicación 15, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

5

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-15, donde la muestra de célula espermática se encuentra descongelada.

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-15, donde la muestra de célula espermática se encuentra congelada.

10

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-12 o 14-20, donde los huevos se cultivaron en un medio de maduración.

22. El método de la reivindicación 21, donde el medio de maduración comprende FBS, piruvato, gonadotropina coriónica, FSH, estradiol y al menos un antibiótico.

15

23. El método de la reivindicación 22, donde el medio de maduración también comprende TCM-199.

20

24. El método de la reivindicación 23, donde el huevo se cultivó en un medio de maduración que comprende TCM-199, FBS, piruvato, gonadotropina coriónica, FSH, estradiol y al menos un antibiótico en una relación aproximada de 9:1:0.02:0.1:0.01:0.01:0.02 en volumen, respectivamente.

5

25. Un embrión clasificado producido mediante el método que comprende:

- a. proporcionar una muestra de célula espermática;
- b. agregar un primer medio;
- c. teñir la muestra de célula espermática en el primer medio;
- 10 d. clasificar la muestra de célula espermática para formar una o más subpoblaciones de células espermáticas;
- e. recolectar la subpoblación de células espermáticas en un segundo medio; y
- f. mezclar la subpoblación de células espermáticas con uno o más huevos para producir uno o más embriones;

15 Donde el primer medio y/o el segundo medio contiene al menos un OSR en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y donde el medio que contiene OSR puede prepararse antes de la adición a la muestra de célula espermática o mediante la adición de una solución concentrada de OSR a la solución de muestra de célula espermática.

20

26. Un embrión clasificado producido mediante el método que comprende las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra de célula espermática;
- b. agregar un primer medio;
- 5 c. teñir la muestra de célula espermática con un primer medio;
- d. clasificar la muestra de célula espermática para formar al menos una subpoblación de células espermáticas;
- e. recolectar la subpoblación de células espermáticas en un segundo medio;
- f. congelar la subpoblación en un tercer medio;
- 10 g. descongelar la subpoblación; y
- h. mezclar la subpoblación de células espermáticas con uno o más huevos para producir uno o más embriones,

Donde al menos uno del primer medio, el segundo medio o el tercer medio contiene al menos un OSR que tiene una concentración en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml y donde el
 15 medio que contiene OSR puede prepararse antes de la adición a la muestra de célula espermática o mediante la adición de una solución concentrada de OSR a la solución de muestra de célula espermática.

27. El embrión como se reivindica en la reivindicación 25-26, donde el OSR se selecciona
 20 del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas,

quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados) tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

5

28. El embrión como se reivindica en la reivindicación 27, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

10 **29.** El embrión de la reivindicación 27, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la muestra de célula espermática.

30. El embrión de la reivindicación 27, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; 15 aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

31. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 22-26, donde la muestra de célula espermática se encuentra descongelada.

20

32. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 22-26, donde la muestra de célula espermática se encuentra congelada.

33. El embrión de cualquiera de las reivindicaciones 25-32, donde el huevo se cultivó en un
5 medio de maduración.

34. El embrión de la reivindicación 33, donde el medio de maduración comprende FBS, piruvato, gonadotropina coriónica, FSH, estradiol y al menos un antibiótico.

10 35. El embrión de la reivindicación 34, donde el medio de maduración también comprende TCM-199.

36. El embrión de la reivindicación 35, donde el huevo se cultivó en un medio de maduración que comprende TCM-199, FBS, piruvato, gonadotropina coriónica, FSH, estradiol y al
15 menos un antibiótico en una relación aproximada de 9:1:0.02:0.1:0.01:0.01:0.02 en volumen, respectivamente.

37. Una composición de células espermáticas que comprende:

- a. una muestra de célula espermática; y
- 20 b. Al menos un OSR que tiene una concentración en el intervalo de 0.01 mg/ml a 5 mg/ml.

38. La composición de células espermáticas de la reivindicación 37, donde la muestra de célula espermática se clasificó.

5 **39.** La composición de células espermáticas de la reivindicación 37 o 38, que también comprende un tinte.

40. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 37-39, que también comprende un diluyente o un medio.

10

41. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40 que también comprende un crioprotector.

42. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 37-41,
15 donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: catalasa, SOD, un mimético de SOD, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, piruvato, mercaptoetanol, BHT, ácido lipoico, flavinas, quininas, vitamina K (y vitámeros relacionados), vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E (y vitámeros relacionados), tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa-cetoglutarato (AKG), malondialdehído (MDA), dimetilarginina asimétrica
20 (ADMA) y sus derivados biológicamente activos.

43. La composición de células espermáticas de la reivindicación 42, donde el OSR se selecciona del grupo que comprende: vitamina B12, vitámeros de vitamina B12, vitamina E, vitámeros de vitamina E, tocoferoles, tocotrienoles, α -tocoferilo, alfa cetoglutarato y sus derivados.

5

44. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 42-43, donde la concentración del OSR agregado se encuentra en el intervalo de 0.05 a 0.5 mg/ml en la muestra de célula espermática.

10 **45.** La composición de células espermáticas de la reivindicación 44, donde la concentración del OSR agregado se selecciona del grupo de: aproximadamente 0.05 mg/ml; aproximadamente 0.1 mg/ml; aproximadamente 0.15 mg/ml; aproximadamente 0.25 mg/ml; aproximadamente 0.35 mg/ml; aproximadamente 0.45 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml.

15 **46.** La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 37 a 45, donde la muestra de célula espermática se encuentra descongelada.

47. La composición de células espermáticas de cualquiera de las reivindicaciones 37-45, donde la muestra de célula espermática se encuentra congelada.

20

COMPOSITIONS AND METHODS FOR IMPROVING THE QUALITY OF PROCESSED SPERM

This application claims priority to U.S. Provisional Applications 61/492,151 filed June 1, 2011, entitled “Method of sorting sperm cells into one or more subpopulations and methods of treating sperm cells to improve motility;” 61/569,143 filed December 9, 2011, entitled “Methods of handling processed sperm cells to improve their quality;” and 61/570,691 filed December 14, 2011, entitled “Methods of handling processed sperm cells to improve their quality,” the contents of which are all incorporated by reference in their entireties.

The present invention generally relates to compositions and methods for the handling of processed sperm populations, including those freshly collected as well as those sorted into one or more subpopulations, and for treating processed and/or handled semen samples and solutions that contain sperm cells to increase the overall quality of the processed sperm, including their viability, motility, fertility, DNA integrity, and in vitro longevity. The present invention also relates to compositions comprising sperm cells and at least one compound that may be an antioxidant, vitamin or other organic stress reducer, the methods of using these compounds to reduce trauma and stress on processed sperm, the resulting sperm and embryo end products, and the methods of use of these products in assisted reproductive technologies (ART) to increase the quality, quantity and viability of embryos, and improved rates of births in animals.

BACKGROUND

Assisted reproductive technology (ART) includes such techniques as in vitro fertilization (IVF), artificial insemination (AI), intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (other techniques using enucleated cells) and multiple ovulation and embryo transfer (MOET) (as well as other embryo transfer techniques), is used across the animal kingdom, including humans and other animals. ART methods are usually expensive, time consuming and marginally successful given the inherent fragility of gametes and embryos when outside of their natural environments. Furthermore, the use of ART within the animal breeding industry in a commercially feasible manner is additionally challenging due to the limited availability of genetically desirable gametes and zygotes. One way to lower the cost of ART and to improve its commercial feasibility is to increase the efficiency of the involved processes by improving the viability and overall quality of gametes and zygotes. Although there is has been a growing interest in this field over the course

of the last decade or so, there still remains a strong need to increase the overall quality of gametes and zygotes for use in ART, especially when breeding focuses on pre-natal gender selection, including improving their viability (in the case of gametes and zygotes), their motility and fertility (in the case of sperm cells), as well as other longevity characteristics.

For example, in conventional AI, one problem limiting its commercial application in certain species is the need to use extremely high number of sperm cells per AI dose to ensure successful fertilization. Similarly, in IVF, the percentage of zygotes that develop into embryos remains frustratingly low; this high rate of loss significantly increases the cost of embryos and related services to end-users. There also remains the need for more efficient and lower cost procedures for improving post-embryo handling through cryopreservation as well as non-frozen transport. Cryopreservation of embryos is limited by the success rate of embryo production as well as blastocyst growth in vitro. Currently, only a marginal percentage of IVF embryos are suitable for cryopreservation which adds to the ongoing high cost of ART procedures.

Especially when processing gametes such as flushed oocytes or sperm cells, both conventional and sex-sorted, before their use in ART adds a tremendous amount of stress on the gamete cell and negatively impacts their cellular integrity and membrane structure which in turn is reflected in decreased viability, motility and fertility. An example of processing gametes prior to their use in ART is the sorting of sperm cells based on sex (known as “gender enrichment” or “sex-sorting”), which is a highly desired procedure to minimize wasted births of the wrong sex for selective breeding in the livestock industry but is often cost prohibitive and can be risky to those with smaller breeding herds.

The popular flow cytometry based sex-sorting process severely stresses and damages the cells and produces a low percentage of useful sperm, which although capable of fertilizing matured oocytes, have reduced viability, motility and fertility after the sex-sorting process. Typically, sex-sorting involves many harsh steps including but not limited to: the initial collection and handling of sperm ejaculate which naturally starts to deteriorate rapidly upon collection; the staining of sperm cells which involves binding of an excitable dye to the DNA or a harmful membrane selection procedure; the physical sorting of the sperm cells using high energy fluorescence that physically energizes the dye that is bound to the DNA, forced orientation through a narrow orifice, and application of an electrical charge to the cell; the physical collection of the cells into a container which often shocks the fragile cell upon contact;

the osmotic stresses associated with dilution of the sperm droplet in collection media; and the storage of the sorted sperm usually by freezing which is well known to raise havoc with the cell's membrane systems. Each step places the processed sperm under abnormal stress which diminishes the overall motility, viability and/or fertility of the sperm. The result can lead to less efficient samples for use in ART, such as IVF and AI, and other types of subsequent or further processing.

Even non-sorted processed sperm exhibits significant losses in fertility, viability and motility when being collected, handled and transported without freezing, and noticeably experiences significant stress when mixed with cryoprotectant and is frozen and thawed. Many in the field have tried to improve methods for the use on unsorted, conventional semen to minimize loss in the handling processes associated with in vitro handling, preservation and use of semen samples.

Regardless of the processing, sperm lose their potential to fertilize when exposed to: elevated temperatures, abnormal buffers, stains, altered pH systems, physical pressurized orientation as when forced through a nozzle or when oscillated to form drops in a flow cytometer, radiation used to illuminate the DNA binding dye, physical stressors associated with separation and collection techniques, cryoprotectants, freezing, thawing and micromanipulation by the handler.

The large class of compounds referred to as antioxidants have been associated with providing beneficial effects to all sorts of cells, in vivo and in vitro, but these effects are as varied as the nature of the antioxidant itself. An antioxidant is simply one of a large variety of molecules that either inhibit the oxidation of another molecule, becomes oxidized itself in place of the target substrate, or binds harmful free radical intermediates and interrupts oxidative chain reactions within a cell. Most have dual roles; some are enzymes, others are non-enzymatic; some others are vitamins and others are cofactors. Such diversity lauds the diversity of antioxidants, but because of their known ability to minimize cell damage, they are frequently lumped together as a single class of compounds having only a single function, to bind free radicals.

Various antioxidants have shown promise in promoting cell integrity with some reports showing positive effects on sperm motility and membrane integrity during cryopreservation, but some tests have been shown to have minimal or even harmful effects on processed sperm.

Similarly, vitamins are again a rather diverse group of molecules having very different biological properties. Vitamins are any of a large group of organic compounds required in very small amounts as vital nutrients for an organism that cannot synthesize it. They can be antioxidants, enzymes, hormones or non-enzymes; they can be regulators of cell growth, cell differentiation or moderators of mineral metabolism.

To date, no studies have sufficiently addressed the use of antioxidants, vitamins or other supplements in the routine handling of fragile gametes during in vitro processing, especially during the harsh processing associated with the sex-sorting of sperm, whereby the end result is a reproducible improvement on the viability, motility and fertility of extensively processed sperm cells and embryos. There remains a continuing need to improve current methods of ART to reduce the cost and to make the procedures more dependable and commercially feasible to those on a tight budget, especially those smaller breeders who view sex-selection breeding as a high risk and expensive option.

SUMMARY OF THE INVENTION

A broad object of the present invention is to provide improvements in the motility, viability, fertility and overall integrity of processed sperm cells. Accordingly, one embodiment of the present invention comprises a method of treating sperm cells by adding at least one “organic stress reducing” agent (OSR) which may comprise an antioxidant, a vitamin or other organic molecule involved directly or indirectly in modulating physiological stresses in the cell. The OSR would be added in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml to a sperm cell sample to form a sperm cell composition. In certain embodiments, one or more OSRs, each in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml, can be added to the sperm cell sample prior to cryopreservation (including, for example, freezing and vitrification), after the sperm cell sample has been thawed, or at both times. In other embodiments, the OSR can be added at one or more of the various stages during the sperm cell processing procedure. The term “sperm cell sample” may comprise a processed semen sample or an unsorted, conventional semen sample.

Another specific embodiment of the invention comprises the sperm cell composition comprising a sperm cell sample and at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml. Another embodiment encompasses a “sperm cell composition” comprising a sperm cell sample, at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml and a cryoprotectant. Most cryoprotectants can be used with the invention, including but not limited to

egg yolk, propylene glycol, dimethyl sulfoxide, sucrose, ethylene glycol and glycerol, or a combination thereof. One embodiment encompasses a fresh, an unfrozen, a frozen, a vitrified, or a thawed sperm cell composition comprising a sperm cell sample and at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml. Another embodiment encompasses a fresh, an unfrozen, a frozen, a vitrified, or a thawed sperm cell composition comprising a sperm cell sample, at least one antioxidant and/or one vitamin in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml, and a stain.

Another broad object of the present invention is to improve the motility, viability (including longevity and ability to survive environmental stress) and/or fertility of sperm cells, each contributing to the sperm cell's overall integrity, to improve the success of using ART, including techniques such as IVF, AI, ICSI (as well as other techniques using enucleated cells), and MOET (as well as other embryo transfer techniques).

Such ART techniques involve different levels of gamete cell processing which in the case of sperm can entail, by example only and is not limited to one or more of the following: artificially collecting a semen sample from the male animal which may involve natural, electronic or other types of sexual stimulation; holding; transporting; buffering with different pHs; chilling; warming; staining; diluting; concentrating; energetically exciting as with a laser; electronic charging; deflecting; ablating to kill unwanted cells usually with targeted lasers; sorting; collecting; shaking; oscillating; magnetically separating; oxygenating as associated with microchip sorting procedures; labeling; precipitating; centrifuging; resuspending; mixing; dialyzing; cryostabilizing; freezing; vitrification; thawing; culturing; inseminating; microinjecting; microfluidic processing; microchip processing; jet and air processing; flow cytometry processing; and similar handling techniques. Whereas a single processing step may exert only minimal stress on a sperm cell, others or a combination may add significant stress, often killing the cell. An extreme example is the sex-sorting process used to separate X- from Y-chromosome bearing cells; the sorting process combines a large number of independent highly stressful steps that severely compromise the overall integrity of the sorted sperm cell population.

Accordingly, one embodiment of the present invention resides broadly in the use of a sperm cell composition, comprising a sperm cell sample and at least one antioxidant and/or at least one vitamin in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml, in ART. One specific embodiment of the invention comprises a method of increasing the percentage of zygotes that

develop into embryos in a given sample in a given amount of time, as well as increasing the percentage of embryos that are suitable for cryopreservation (i.e., the percentage of embryos that are blastocysts, expanded and hatching blastocysts, or hatched blastocysts), by mixing an egg with a sperm cell sample that has been treated with at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml. A further embodiment of the invention resides in a method of making an embryo comprising mixing at least one egg with a sample of sperm cells treated with at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml. The embryos produced by this method constitute a further embodiment of the invention. Another embodiment includes a method for inseminating an organism through an AI technique using a sperm cell sample treated with at least one OSR in the concentration of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml. Another embodiment includes a method of transferring an embryo into a receptive female (ET) where said embryo is made using a sperm cell sample treated with at least one OSR in the concentration of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml. The progeny of the organism that results from the aforementioned AI method also constitutes an embodiment of the invention.

Most embodiments of the invention utilize concentrations of OSRs selected from the following ranges: 0.01 to 5.0 mg/ml; 0.01 to 0.25 mg/ml; 0.01 to 0.5 mg/ml; 0.01 to 1 mg/ml; 0.01 to 2.5 mg/ml; 0.01 to 5 mg/ml; 0.05 to 0.1 mg/ml; 0.05 to 1.0 mg/ml; 0.05 to 2.5 mg/ml; 0.1 to 0.25 mg/ml; 0.1 to 0.5 mg/ml; 0.1 to 1 mg/ml; 0.1 to 2.5 mg/ml; 0.1 to 5 mg/ml; 0.15 to 0.45 mg/ml; 0.15 to 0.5 mg/ml; 0.25 to 0.35 mg/ml; 0.25 to 0.5 mg/ml; 0.25 to 1 mg/ml; 0.25 to 2.5 mg/ml; 0.25 to 5 mg/ml; 0.35 to 0.5 mg/ml; 0.35 to 1 mg/ml; 0.35 to 2.5 mg/ml; 0.35 to 5 mg/ml; 0.5 to 1 mg/ml; 0.5 to 2.5 mg/ml; 0.5 to 5 mg/ml; 1 to 2.5 mg/ml; 1 to 5 mg/ml; about 0.05 mg/ml; about 0.1 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.45 mg/ml; and about 0.5 mg/ml.

In some embodiments of the invention the sperm cell composition can be used immediately or processed within the first few minutes after addition of the OSR for whatever processing step is needed, whereby the holding period would be in the range 2 sec to 3 min. In other embodiments, the sperm cell composition is held after the addition of the OSR(s) to allow the OSR(s) to incorporate into the cells and effectuate protective effects on the cell population. Such holding periods can be short, as in the range of a 3-15 minutes, moderate as in the range of 15 min to 1 hr; and longer processing periods ranging up to about 8 hrs or overnight for extensive processing such as with sex-sorting techniques. Transportation hold periods associated

with transporting unfrozen sperm cell compositions can be much longer, extending up to a few days, which may for example occur if the sample is collected, treated with the addition of one or more OSRs, transported or shipped to another location possibly by air, and further processed at the second location as for sex-sorting at a designated facility. In other instances, the sperm cell composition might need to be held for a few days while a recipient female is hormonally prepped for artificial insemination, as might occur if a sample is mistakenly thawed and cannot be refrozen. The addition of OSRs could theoretically prolong these extended hold periods over what is currently accepted in the art, and could provide sufficient protection to the sperm in the sperm cell composition so that they could remain viable and fertile for up to a week or more.

In some embodiments of the invention, the OSR is added several times during a complex processing procedure to minimize cell stress throughout the procedure. In other embodiments, the OSR is added only at one or more particular steps which are notably harsh on the cells to help minimize stress and fatigue on the sperm cells. By way of example, the staining process during sex sorting is often performed at non-physiological pH and at elevated temperatures, both known to be harsh on the cells. Similarly, cryopreservation is also extremely harsh on the cells and disrupts cell membranes, both internal and external. Following an intensive multi-step sorting procedure, sex-sorted sperm cells which are already compromised are even more susceptible to cryogenic and freeze processing.

Various OSRs can be used in the context of the current invention, including but not limited to: catalase, superoxide dismutase (SOD), SOD mimics, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, butylated hydroxytoluene (BHT), lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12 (and related vitamers), with 'vitamers' defined as compounds having the same vitamin activity (such as cobalamin, cyanocobalamin, methylcobalamin, adenosylcobalamin, hydroxocobalamin, and pseudo-B12), vitamin E (including its vitamers, tocopherols (α , β , γ), tocotrienols, and α -tocopheryl), alpha-ketoglutarate (also known as α -KG, AKG or oxo-glutarate) and various biological forms of AKG (such as arginine, aspartate, lysine, and similar derivatives), other compounds that regulate nitric oxide in the cell including malondialdehyde (MDA) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.

A further embodiment of the invention comprises a method of sorting a sperm cell sample to form one or more subpopulations comprising the steps of providing a sperm cell sample, sorting the sperm cell sample to form one or more subpopulations and adding at least one OSR to the sperm cell sample during one or more of the aforementioned sorting steps, the concentration of the OSR being in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml.

An additional embodiment of the invention encompasses media used in processing sperm cells that comprise at least one OSR at the appropriate stock concentration to be present at a final processing concentration in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml in the sperm cell composition at the time of processing. A stress reducing media can be used for different processes including but not limited to sperm collection, artificial insemination, sperm sorting, in vitro fertilization, embryo culture, as well as sperm and embryo freezing. Media used in the sorting of sperm cells typically comprise one or more buffers and/or extenders (i.e., substances that preserve the viability and/or fertility of sperm cells).

Any buffer or buffer solution used in the processing of sperm can be used in the aforementioned media, including but not limited to phosphates, citrates, acetates, lactates, and combinations thereof, or a solution containing a salt, a carbohydrate, or a combination thereof can be employed in some of the embodiments of the invention, such as, but not limited to: Tris, TES, HEPES, TALP, TCA, PBS, citrate, milk and derivatives thereof, as discussed in detail in U.S. Patent 7,208,265 the contents of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

Any extender used in the processing of sperm can be used in the aforementioned media, including but not limited to energy sources, protein sources and antibiotics and may include one or more of the following: mono- and disaccharides, such as fructose, glucose, mannose, sucrose, and lactose; protein sources, such as egg yolk, milk, BSA and derivatives thereof; and any one of the commonly known antimicrobial or antibiotic agents, such as gentamicin, lincomycin, spectinomycin, their derivatives, or any combination thereof.

As used herein, the term "extender" may also include certain organic substances such as disaccharides, trisaccharides, and any combination thereof, egg yolk, milk, albumin, lecithin, cholesterol, their derivatives and any combination thereof. An extender may also include a detergent that may be an alkyl ionic detergent, such as sodium dodecyl sulfate (SDS).

A further embodiment of the present invention provides a method of improving the motility, viability and/or fertility of a sperm cell sample that has already undergone a sorting

process, including but not limited to sex sorting, comprising the step of adding at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml to a sorted sperm cell sample to form a sperm cell composition.

Accordingly, the present invention resides broadly in the use of a sperm cell composition, that in some embodiments comprise a sorted sperm cell sample and at least one OSR in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml, for use in ART. A further embodiment encompasses a sperm cell composition comprising sorted sperm cells, at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml and a catch media (i.e., media found in the vessel that receives, or catches, the sorted sperm at the end of the sorting process). Another embodiment encompasses a sperm cell composition comprising a processed or sorted sperm cell sample, an OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml, and a cryoprotectant. An additional embodiment of the invention encompasses a frozen or vitrified sperm cell composition comprising a processed or sorted sperm cell sample, and at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml.

Another broad object of the present invention is to improve the motility, viability (including longevity and ability to survive environmental stress) and fertility of processed and/or sorted sperm cells for use in ART such as IVF, AI, ICSI (as well as other techniques using enucleated cells), and MOET (as well as other embryo transfer techniques).

Accordingly, some of the embodiments of the present invention incorporate the use of sex sorted sperm cells that have had an OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml added to them in ART.

Accordingly, other embodiments of the present invention incorporate the use of a sperm cell composition, a sorted sperm cell sample, and at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml, in ART.

One specific embodiment of the invention comprises a method of increasing the percentage of zygotes that develop into embryos in a given sample in a given amount of time, as well as increasing the percentage of embryos that are suitable for cryopreservation (i.e., the percentage of embryos that are blastocysts, expanded and hatching blastocysts, and hatched blastocysts), by mixing an egg with a sorted sperm cell sample that has been treated with at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml.

A further embodiment of the invention resides in a method of making an embryo comprising mixing at least one egg with at least one sperm cell treated with at least one OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml. The embryos produced by this method constitute a further embodiment of the invention.

Other embodiments of the invention also include, a method for inseminating an organism through an AI technique using a processed or sorted sperm cell sample treated with at least one OSR in the concentration of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml. The progeny of the organism that results from the aforementioned AI method also constitutes an embodiment of the invention. Furthermore, one embodiment of the invention encompasses a method for recovering embryos that are produced from the aforementioned AI method.

Embodiments of the invention can include sperm cells, or spermatozoa, collected from numerous species of male mammals, and the invention should be understood not to be limited to the species of male mammals described by the specific examples within this application. Rather the specific examples within this application are intended to be illustrative of the varied and numerous species of male mammals from which semen can be collected and utilized in certain embodiments of the invention. Embodiments of the invention, for example, may include the sperm cells of humans as well as animals having commercial value for meat or dairy production such as swine, ovine, bovine, equine, deer, elk, buffalo, or the like (naturally the mammals used for meat or dairy production may vary from culture to culture). It may also include the sperm cells of various domesticated mammalian species encompassed by canines and felines, as well as sperm cells of primates, including but not limited to chimpanzees, gorillas, or humans and the spermatozoa from whales, dolphins and other marine mammals. It may also include frozen-thawed sperm cells from all the various mammals above-described and further, including but not limited to, the sperm cells of deceased donors, from rare or exotic mammals, zoological specimens, or endangered species.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

In order that the invention may be more clearly understood, preferred embodiments of the present invention will now be described by way of example only with reference to the accompanying sheets of drawings wherein:

Figure 1 is a schematic representation of part of a flow cytometer illustrating a method of sorting a sperm cell sample into one or more subpopulations according to some embodiments of the present invention.

Figure 2 illustrates a graphical representation of the motility and progressive motility found in Table 1.

Figure 3 is a graphical representation of the percent blastocysts and percent hatching found in Table 4.

Figure 4 is a graphical representation of the percent blastocysts and percent hatching found in Table 5.

Figure 5 is a graphical representation of the percent motile sperm found in Table 1.

Figure 6 is a graphical representation of the percent progressively motile sperm found in Table 1.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In one aspect of the present invention, Figure 1 illustrates in schematic form part of a flow cytometer used in a method to sort a sperm cell sample to form one or more subpopulations, the flow cytometer being generally referenced 10. In this particular embodiment sex sorting is taking place so the subpopulations are X-chromosome bearing sperm cells and Y-chromosome bearing sperm cells. Figure 1 represents a single technique for sorting semen, but any known technique for sorting cells known in the art can be used with certain embodiments of the invention. Additional details of the basic sperm sorting apparatus and methodology are described in U.S. Patents 5,135,759 and 7,371,517, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entireties.

Once a sperm cell sample has been collected it can be extended as soon after collection with an extender that includes one or more antioxidants or vitamins. The sample is then typically held at a temperature of about 5°C for between about 12 hours to about 18 hours while it is being shipped from the collection point to the flow cytometer 10 for the sorting process. This holding temperature can be in the range of between 4°C and 39°C and is commonly in the range of 4°C and 16°C.

Upon arrival at the flow cytometer, the sample is stained with a DNA selective dye and a quenching dye to form a stained sperm cell sample and subsequently placed into a sperm cell source 11 of the flow cytometer 10. The flow cytometer 10 can be programmed by an operator

to generate two charged droplet streams, one containing X-chromosome bearing sperm cells, charged positively, 12, one containing Y-chromosome bearing sperm cells, charged negatively 13 while an uncharged undeflected stream of dead cells 14 simply goes to waste.

An operator may also choose to program the flow cytometer in such a manner, that both the X- and Y-chromosome bearing sperm are collected using a “high purity sort” (in other words only live X- and Y-chromosome bearing sperm are collected) or to program the flow cytometer to collect both the X- and Y-chromosome bearing sperm using an “enriched sort” (in other words it will collect droplets containing live that were not previously sorted and excluding all initial dead again by the use of Boolean Gate logic available with the computer that controls the flow cytometer). The Boolean Gate logic can also be used to collect only one of either the X- or Y-chromosome bearing sperm.

Initially, a stream of sperm cells under pressure, is deposited into the nozzle 15 from the sperm cell source 11 in a manner such that they are able to be coaxially surrounded by a sheath fluid supplied to the nozzle 15 under pressure from a sheath fluid source 16. An oscillator 17 which may be present can be very precisely controlled via an oscillator control mechanism 18, creating pressure waves within the nozzle 15 which are transmitted to the coaxially surrounded sperm cell stream as it leaves the nozzle orifice 19. As a result, the exiting coaxially surrounded sperm cell stream 20 could eventually and regularly form droplets 21.

The charging of the respective droplet streams is made possible by the cell sensing system 22 which includes a laser 23 which illuminates the nozzle exiting stream 20, and the light emission of the fluorescing stream is detected by a sensor 24. The information received by the sensor 24 is fed to a sorter discrimination system 25 which very rapidly makes the decision as to whether to charge a forming droplet and if so which charge to provide the forming drop and then charges the droplet 21 accordingly.

A characteristic of X-chromosome bearing sperm is that they tend to absorb more fluorochrome dye than Y-chromosome bearing sperm and as such, the amount of light emitted by the laser excited absorbed dye in the X- chromosome bearing sperm differs from that of the Y-chromo-some bearing sperm and this difference in characteristic tells the sorter discrimination system 25 which charge to apply to droplets containing only X- or only Y- chromosome bearing sperm cells. Dead cells (or those about to die) have absorbed the quenching dye and the sorter discrimination system 25 does not charge droplets containing such cells.

The charged or uncharged droplet streams then pass between a pair of electrostatically charged plates 26, which cause them to be deflected either one way or the other or not at all depending on their charge into respective collection vessels 28 and 29 to form respectively a gender enriched population of X-chromosome bearing and a gender enriched Y-chromosome bearing sperm cells having a DNA selective dye associated with their DNA. The uncharged non-deflected stream containing a sub-population of dead cells (or those that are about to die) go to the waste container 30.

The collected sex sorted sperm cells may then be frozen and stored or frozen and sent on for further processing (or simply used for further processing immediately), further processing meaning for example, the purposes of research or for use in ART such as IVF, AI, ICSI (as well as other techniques using enucleated cells), and MOET (as well as other embryo transfer techniques).

In alternative embodiments not illustrated, the catch media contained in the otherwise empty collection vessels may also contain OSR in the concentration range of 0.01mg/ml to 5mg/ml. The OSR may be added during this stage of the sorting process (be it sex sorting or other form of sorting) and/or in addition to another method step in the sorting (be it sex sorting or other form of sorting) process.

Furthermore, in the alternative embodiments, the OSR administered in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml to the sperm cell sample or composition can be added to the DNA selective dye and/or the quenching dye solutions. Some embodiments include use of one or more OSRs as pre-mixed components of the prepared buffers, extenders, stains, catch fluids, and/or cryo-extenders used in the sex sorting procedure. Accordingly, the OSR may be added to the sperm cell sample at one or more steps during sex-sorting, including when the sperm cell sample is being first handled following collection, and/or stained with a DNA selective dye and/or the quenching dye, and/or at the time of collection from the flow cytometer, and/or later when preparing the sample for cryopreservation by adding the OSR or OSR cocktail to the cryo-extender.

Likewise, some sorting embodiments include sorting of frozen-thawed conventional semen whereby the OSR can be added to the thawed semen sample shortly after thawing and then reverse sorted to produce sex-sorted sperm cell subpopulations which include the addition of an OSR at one or more steps during the extended processing procedure of gender selection.

In some cases, when the sorting of sperm cells is not going to involve sex sorting, a quenching dye without the need for a DNA staining dye may be required, in which case the OSR will only be present in the quenching dye to form the stained sample. In this way, depending on the embodiment chosen, the OSR may again only be added during this stage of the sorting process (be it sex sorting or other form of sorting) or in addition to at least one other method step in the sorting (be it sex sorting or other form of sorting) process.

Again, in the alternative embodiments, the collected sex sorted sperm cells (or in alternative embodiments the sorted, i.e. non-sex sorted sperm cell samples) once frozen will, prior to such further processing, require to be thawed. Either before freezing or upon thawing, the antioxidant, again in the concentration range of 0.01mg/ml to 5mg/ml, may be added to the sample before freezing and/or to the thawed sample. In this way, depending on the embodiment chosen, the OSR may again only be added during this stage of the sorting process (be it sex sorting or other form of sorting) or in addition to at least one other method step in the sorting (be it sex sorting or other form of sorting) process.

In yet further alternative embodiments the time period allowed to elapse after the addition of the OSR, can vary and may be in the range of about 5 seconds to about 72 hours (excluding freezing time and time spent in the freezer or in the cryopreserved state), the lower end of the scale providing for almost immediate sorting of the sperm sample while the upper end of the scale would cover the typical maximum time frame associated with moving a sperm sample from its collection point to its sorting point. This is usually a flight and/or road travel time. More particularly, the time periods may be about 5 seconds to about 3 hours; about 3 hours to about 6 hours; about 6 hours to about 12 hours; about 12 hours to about 18 hours; about 18 hours to about 24 hours; about 24 hours to about 36 hours; about 36 hours to about 48 hours; about 48 hours to about 60 hours; and about 60 hours to about 72 hours; and .

Another alternative embodiment may include the use of an extender within a pH range of 5.5 to 7.8, and frequently at about 6.5; about 6.6; about 6.7; about 6.8; about 6.9; about 7.0; about 7.1; about 7.2; about 7.3; about 7.4; or about 7.5.

As described in the illustrated embodiment, different steps of the method are carried out at different temperatures. In alternative embodiments, at least one of the method steps is carried out within a temperature range selected from the group consisting of about 5°C to about 15°C; about 15°C to about 20°C; about 20°C to about 25°C; about 25°C to about 30°C; about 30°C to

about 35°C; about 35°C to about 40°C and about 40°C to about 45°C. This allows for different steps in the sorting method to be performed within different temperature ranges.

In another aspect of the present invention there is provided a method of treating the motility of sperm cells in a sperm cell sample. In this embodiment, the sperm cell sample, which may be a gender enriched population of X-chromosome bearing or Y-chromosome bearing sperm cells having a DNA selective or DNA binding dye associated with their DNA, a sample sorted into one or more subpopulations or a conventional non-sorted sample, the method of treating the motility of the sperm cells in the sperm cell sample comprises the step of adding an OSR in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5mg/ml to the sperm cell sample to form a sperm cell composition (and in this embodiment at a concentration of 0.5 mg/ml). The OSR which is added forms part of an extender which is in a pH range of 6.5 to 7.5 and in particular embodiments, the pH is selected from the group consisting of about 6.5; about 6.6; about 6.7; about 6.8; about 6.9; about 7.0; about 7.1; about 7.2; about 7.3; about 7.4; and about 7.5.

After the addition of the antioxidant, a time period being in the range of about 5 seconds to about 72 hours is allowed to elapse before the sample undergoes further processing in the form of for example, research or for use in assisted reproductive technologies such as IVF, AI, ICSI (as well as other techniques using enucleated cells), and MOET (as well as other embryo transfer techniques). The time period which is allowed to elapse may be selected from the range consisting of: about 5 seconds to about 3 hours; about 3 hours to about 6 hours; about 6 hours to about 12 hours; about 12 hours to about 18 hours; about 18 hours to about 24 hours; about 24 hours to about 36 hours; about 36 hours to about 48 hours; about 48 hours to about 60 hours; and about 60 hours to about 72 hours. The techniques for fertilizing an egg involve the added step of mixing at least one egg with the sperm cell sample. Any conventional technique such as those listed above can be used with the invention, including any conventional IVF or AI technique. Typical IVF techniques are disclosed in WO/0243486, for example, which is incorporated by reference herein in its entirety. Typical AI techniques are disclosed in U.S. Patent No. 6,149,867, for example, which is incorporated by reference herein in its entirety.

In alternative embodiments, the sperm cell sample may have been a frozen sample that has been allowed to thaw. The method may further comprise the step of staining the sperm cell sample or the sperm cell composition with a DNA selective dye if the sample is not a sex sorted sample.

The method may also comprise the step of freezing the sperm cell composition to form a frozen sperm cell composition that may be allowed to thaw. At least one of the method steps in this second aspect of the present invention is carried out within a temperature range selected from the group consisting of about 0°C to about 5°C; about 5°C to about 15°C; about 15°C to about 20°C; about 20°C to about 25°C; about 25°C to about 30°C; about 30°C to about 35°C; about 35°C to about 40°C and about 40°C to about 45°C. Thus, each method step may be carried out at a different or similar temperature range.

SUGGESTED METHODS

By way of example, the following oocyte maturation procedure, IVF procedure, in vitro culture procedure and co-culture procedure may be used with the invention. One skilled in the art will know that variations on these methods exist and that these methods should not be construed to limit the functionality of the current invention. These methods are illustrative only.

1. Oocyte Collection. Collect slaughterhouse oocytes, wash 1X with about 3mL Hepes washing media and with 1X with TCM-199 (Invitrogen, Carlsbad, CA) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Culture in maturation media for 22 hrs in a CO₂ incubator at 38.5°C. In one embodiment, the maturation media contains TCM-199, FBS, pyruvate, chorionic gonadotropin (e.g., Chorulon (Intervet, Summit NJ)), follicle stimulating hormone (FSH) (e.g., Folltropin (Bioniche, Belleville, Canada)), estradiol, and at least one antibiotic. In a further embodiment, Amikacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) can be used as the antibiotic. In another embodiment, the maturation media may also comprise luteinizing hormone.

In one embodiment, the maturation media may comprise 5-20 ml of TCM-199 Earl's; 0.5-2ml of FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); 10-30 µl of pyruvate (prepared by adding 0.05-0.20 g of sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to 5-20 ml of saline solution); 50-200 µl of chorionic gonadotropin (prepared by adding 5-20 UI of Chorulon (Intervet, Summit NJ) to 5-20 ml of TCM-199 Earl's); 5-20 µl of FSH (prepared by adding 0.001-0.01 g of Folltropin (Bioniche, Belleville, Canada) to 5-20 ml of TCM-199 Earl's); 5-20 µl of estradiol (prepared by adding 0.001-0.05 g of estradiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to 5-20 ml of Etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)); and 10-30 µl Amikacin (prepared by adding 0.1-1 g Amikacin sulfate salt (Sigma-Aldrich) to 20-40 ml of saline solution). In alternative embodiments, the maturation media may comprise the aforementioned components using different volumes but in the same proportion to each other, e.g., in one embodiment, the

maturation media may comprise 10-40 ml of TCM-199; 1-4 ml of FBS; 20-60 μ l of sodium pyruvate, etc. In a further embodiment, the maturation media comprises the above preparations of TCM-199 Earl's, FBS, pyruvate, chorionic gonadotropin, FSH, estradiol and an antibiotic in the approximate ratio of 9 : 1 : 0.02 : 0.1 : 0.01 : 0.01 : 0.02 by volume, respectively.

2. In Vitro Fertilization. Trim away cumulus cells from matured oocytes. Transfer them to a fertilization dish and return to the CO₂ incubator. Thaw frozen semen straws using standard procedures, centrifuge in 800 μ L of Pure Sperm gradient (Nidacon, Molndal, Sweden), or a percoll or similar gradient at 2500 RPM for 10 minutes to remove egg components, glycerol and other debris. Remove supernatant, leaving a loose pellet of live sperm. Combine pellets using a small amount of fertilization media and repellet at 1500 RPM for 3 minutes. Carefully remove supernatant. Then gently mix the pellet. After determining the desired insemination dose, inseminate the oocytes by adding sperm to the pellet, then culture in a dish and return to the CO₂ incubator for about 18-22 hours.

3. In Vitro Culture. Remove presumptive zygotes from the fertilization dish and transfer into a sterile 1.5 mL eppendorf tube. Allow zygotes to form a loose pellet and remove excess media to form a 1:1 ratio of pellet and solution. Rinse the eppendorf tube with TCM-199, place contents into a dish and wash with BSA media. Then culture presumptive zygotes (discard disfigured oocytes, as well as oocytes with yellow colored cytoplasm or vacuolated cytoplasm) in a dual gas incubator (5% CO₂, 5% O₂) at 38.5°C for about 48 hours.

4. Co-culture. Transfer cleaved zygotes to co-culture dishes comprising the cumulus cells from the mature oocytes and FBS media topped with mineral oil, and incubate in a CO₂ incubator at 38.5°C until needed.

5. Sperm Motility Evaluations by CASA. A comparison of viewing chambers and slides can be done in a variety of IVOS instruments, which for example only can be a Hamilton-Thorne IVOS (Hamilton-Thorne, Beverly, MA). Instrument settings: image capture; frames per second = 60; number of frames = 30; cell detection; minimum contrast = 50; minimum cell size = 5; defaults, cell size = 5; cell intensity = 50; progressive cells, path velocity = 50 μ m/s; straightness $\geq$ 70%; slow cells (μ m/s); average path velocity (VAP, <30 μ m/s), straight-line velocity (VSL, <15 μ m/s). The CASA motility variables measured can be a percentage of total motile sperm (motile), percentage of progressively motile sperm (progressive), VAO, VSL, curvilinear velocity (VCL, μ m/s), average lateral head displacement (ALK, μ m) and the number of times the

sperm head crosses the mean path/s (BCF, Hz), straight-line sperm motility (STR, %), and linear sperm motility (LIN, %). See for instance, Lenz, RW, et al., J Anim Sci (2011) 89:383-388, incorporated by reference herein in its entirety.

A further aspect of the present invention entails the use of a sperm cell sample treated with an OSR in AI. AI in the present invention includes a method whereby a fresh or frozen thawed sperm cell sample is used to inseminate by way of passage of the semen or sperm sample into the female reproductive tract, with or without an accessorizing tool such as an AI gun, catheter or pipette.

Frozen semen samples may be contained in semen straws, which are thawed before the AI procedure using standard methods. In certain embodiments of the invention, the semen straws contain about 0.25-0.5 ml of fluid and are often sufficient for a single insemination.

To increase the number of offspring that a female can produce, embryo transfer techniques (such as MOET) have been developed and are well known to those skilled in the art. Conventional embryo transfer techniques include injection of females with suitable hormones that cause them to produce multiple eggs (oocytes) in a single estrous cycle. This process is often referred to as superovulation. Each female is then artificially inseminated with a sperm cell sample from a male that is either fresh or has been cryopreserved.

In another aspect of the invention, zygotes and/or embryos from artificially inseminated females can be recovered and then cultured and/or cryopreserved/vitrified.

Example 1

One set of semen from each bull was used as a control while to the remaining sets of semen samples were added vitamin B12, as the antioxidant, at respective concentrations of 0.5mg/ml and 0.25mg/ml. For each sample, the same concentration of vitamin B12 was added (i) during the staining process, and (ii) in the catch fluid of the collection vessel. Control samples did not contain vitamin B12. Sperm samples were sorted in "High Purity" mode, and the collected sex-sorted sperm were extended with a cryoextender, which in some cases again contained the same concentration of vitamin B12 and the samples were frozen. Three hours after thawing (which is a standard time frame to conduct quality control assessments on sorted frozen thawed sperm samples) the thawed samples were put through CASA, a machine that provides various data on sperm including motility and progressive motility information. The results are

shown below in Table 1 and the motility and progressive motility are graphically represented in Figure 2.

In the tables below: VAP (average path velocity ($\mu\text{m/s}$)); VSL (straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$)); VCL (curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$)); ALH (average lateral head displacement (μm)); BCF (the number of times the sperm head crosses the mean path/s in Hz); STR (percent straight-line sperm motility); LIN (percent linear sperm motility); PIA (percent intact acrosomes); motile (percent motile sperm); and progressive (percent progressively motile sperm).

The two step addition results represent treatments with vitamin B12 present at the same indicated concentration in the catch fluid of the collecting vessel and in the cryoprotectant extender prior to freezing the sample only (2 step-freeze; - + +); the three step addition results indicate that the same concentration of vitamin B12 was added during the staining step, the collecting step (in the catch fluid of the collecting vessel) and in the cryoprotectant extender prior to freezing the sample (3 step). There is no correlation with regard to randomly assigned names such as “Bull A.” Bull A from Example 5 is not the same bull as Bull A from Example 7.

TABLE 1: Motility (2 step and 3 step) (3 hrs Post-Thaw)

	Total cells	Motile (%)	Prog Mot (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Bull 1											
Control	562	59.5	33.5	54	47	95.5	4	21.5	87.5	51	73.5
0.5mg/ml, 2 step F	925	63.5	26	56	45	94	4	23	86.5	49	74
0.25mg/ml, 3 step	815	70.5	40.5	55	48	92	4	23.5	87.5	53	83
Bull 2											
Control	529	54.5	41.5	61	53.5	107.5	4.5	23	87.5	51.5	64
0.5mg/ml, 2 step F	269	70.5	47	77	66	108	4	21.5	85.5	61	84
0.25mg/ml, 3 step	693	67	53.5	68	55	111.5	4.5	24	87	51	79.5
Bull 3											
Control	599	47.5	18	49.5	42.5	84.5	4	20.5	86.5	51.5	52.5
0.5mg/ml, 2 step F	800	74.5	53.5	56	51	98	4	22.5	84.5	52.5	87
0.25mg/ml, 3 step	656	70	48.5	59	50	101	4	24	85.5	51	80
Bull 4											
Control	602	65.5	33.5	53.5	45.5	89.5	4	23.5	86	52.5	72.5
0.5mg/ml, 2 step F	874	81.5	50	60	53	109	5	26	83.5	49	88
0.25mg/ml, 3 step	1059	81	25.5	43	51	88.5	5	23	82.5	47	86

Bull 5											
Control	638	49.5	13	45.5	38.5	86.5	5	18	84	45.5	63.5
0.5mg/ml, 2 step F	842	51	33	50	47	101	5	20.5	84	47	79
0.25mg/ml, 3 step	787	70	40.5	61	48	106.5	5	21.5	84.5	47	80

Example 2

In another series of experiments, the CASA results regarding motility and progressive motility after 4.5 hours after thawing sex-sorted samples against a control are shown below in Table 2. The (2 step-freeze) results indicate that vitamin B12 at the same concentration was present in the catch fluid of the collecting vessel and in the cryoprotectant extender prior to freezing the sample; the (3 step) results indicate that the same concentration of vitamin B12 was added during the staining step, the collecting step (in the catch fluid of the collecting vessel) and in the cryoprotectant extender prior to freezing the sample.

With respect to “Bull A,” the two sets of results shown were obtained on two different days using thawed samples from the same initially sorted batch of sperm. In both cases the concentration of the vitamin B12 was 1mg/ml. For all other bulls in the table below unless otherwise indicated, the concentration of vitamin B12 added was also 1mg/ml.

TABLE 2: Motility (4.5 hrs Post-Thaw)

	Total cells	Motile	Progressive
Bull A			
control	322	38	0
1 mg/ml – 2 step-F	250	41	8
1 mg/ml – 3 step	287	64	37
Bull A (day 2)			
control	328	46	4
1 mg/ml – 2 step-F	433	71	31
1 mg/ml – 3 step	487	64	11
Bull B			
control	298	33	1
1 mg/ml – 2 step-F	316	22	1
1 mg/ml – 3 step	237	59	19
Bull C			
control	403	52	1

1 mg/ml – 2 step-F	432	76	43
1 mg/ml – 3 step	613	62	2
Bull D			
control	644	37	3
1 mg/ml – 3 step	400	59	9
Bull E			
control	653	41	1
1 mg/ml – 3 step	648	52	1
Bull F			
control	638	39	7
0.5 mg/ml – 3 step	761	51	16
0.25 mg/ml – 3 step	730	60	23
Bull G			
control	588	41	13
0.5 mg/ml – 3 step	162	65	57
0.25 mg/ml – 3 step	1003	56	32

Example 3

In an additional experiment, motility and progressive motility were checked 3.75 hours after thawing a sex sorted semen sample treated with the antioxidant. The OSR was not added to the control sample. The semen sample was derived from a single bull. 0.25 mg/ml concentration of vitamin B12 was added to the test sample during the staining step, the collecting step (in the catch fluid of the collecting vessel) and in the cryoprotectant extender prior to freezing the sample. The results are shown in Table 3 below.

TABLE 3: Motility (3.75 hrs Post-Thaw)

	Total cells	Motile (%)	Prog Mot (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Bull 1											
Control	452	7	0	37	28	71	3	16	74	40	41
0.25mg/ml, 3 step	536	39	5	40	34	76	5	17	85	45	70

Example 4

An experiment was designed to test the effect of OSR treated sperm cells on the development of eggs fertilized with those sperm cells. In this experiment, bull semen from two

bulls was sex sorted with flow cytometry, with vitamin B12 present at equal concentrations in the media used to stain the sperm cells, in the catch fluid of the collecting vessel and in the cryoprotectant extender prior to freezing the sex sorted sample (3 step). For each bull, three different concentrations of vitamin B12 were tested: 0.05mg/ml, 0.15mg/ml and 0.25mg/ml. The control samples were not treated with vitamin B12.

Slaughterhouse oocytes were collected and washed 1X with about 3mL Hepes washing media and with 1X with TCM-199 + 10% FBS. The oocytes were then cultured in maturation media for 22 hrs in a CO₂ incubator at 38.5°C. Cumulus cells were trimmed away from matured oocytes, transferred to a fertilization dish, and returned to the CO₂ incubator.

Frozen semen straws were thawed using standard procedures and centrifuged in 800µL of Pure Sperm gradient at 2500 RPM for 10 minutes in order to remove egg, glycerol and other debris. The supernatant was removed, leaving a loose pellet of live sperm. Pellets were combined using a small amount of fertilization media and repelleted at 1500 RPM for 3 minutes. The supernatant was then carefully removed and the pellet gently mixed. After determining the desired insemination dose, the matured oocytes were then inseminated by adding sperm to the pellet, cultured in a dish and returned to the CO₂ incubator for about 18-22 hours.

Presumptive zygotes were removed from the fertilization dish and transferred into a sterile 1.5 ml eppendorf tube. The zygotes were allowed to form a loose pellet and excess media was removed to form a 1:1 ratio of pellet and solution. The eppendorf tube was vortexed for 90 seconds and then rinsed with TCM-199. The contents were placed into a dish and then washed with BSA media. The presumptive zygotes were then cultured in a dual gas incubator (5% CO₂, 5% O₂) at 38.5°C for about 48 hours. Cleaved zygotes were then transferred to co-culture dishes comprising the cumulus cells from the mature oocytes and FBS media topped with mineral oil and incubated in a CO₂ incubator at 38.5°C.

Embryos were observed 7 days after IVF to check: Zyg (the number of zygotes put into culture); 4-2C (the number of zygotes that underwent the 2 cell to 4 cell transition 48 hours after IVF); 8C (the number of zygotes with 8 cells 48 hours after IVF); 8C% (the percentage of zygotes having 8 cells 48 hours after IVF); % Clv (percent cleaved 48 hours after IVF); C1 (number of expanded and hatching and hatched blastocysts 7 days after IVF); C1- (number of blastocysts 7 days after IVF); and C2 (number of early blastocysts and compact morulas 7 days after IVF), Total Embs (total number of blastocysts = C1+ C1- + C2); Blast % (percent of

cultured zygotes resulting in blastocyst formation); Hatch # (the number of embryos shedding the zona palucida in preparation for implantation observed at 8.5 days after IVF); and Hatch % (percentage of embryos that shed the zona). The results are provided in Table 4 below.

TABLE 4: IVF - Embryo / Fertilization (3 step)

	Zyg	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Total Embs	Blast %	Hatch #	Hatch %
Bull A												
Control	96	36	8	8.3	45.8	1	0	5	6	6.3	2	33.3
Control	68	19	7	10.3	38.2	0	0	2	2	2.9	0	0.0
Control	91	31	19	20.9	54.9	2	3	10	15	16.5	5	33.3
Total/Avg	255	86	34	(13.3)	(47.1)	3	3	17	23	(9.0)	7	(30.4)
0.05mg/ml	87	20	3	3.4	26.4	0	0	1	1	1.1	0	0.0
0.05mg/ml	95	26	9	9.5	36.8	1	0	1	2	2.1	1	50.0
0.05mg/ml	94	20	11	11.7	33.0	0	3	1	4	4.3	1	25.0
Total/Avg	276	66	23	(8.3)	(32.2)	1	3	3	7	(2.5)	2	(28.6)
0.15mg/ml	89	25	4	4.5	32.6	0	1	4	5	5.6	0	0.0
0.15mg/ml	90	29	9	10.0	42.2	1	0	4	5	5.6	3	60.0
0.15mg/ml	91	24	6	6.6	33.0	2	1	4	7	7.7	3	42.9
Total/Avg	270	78	19	(7.0)	(35.9)	3	2	12	17	(6.3)	6	(35.3)
0.25mg/ml	91	33	6	6.6	42.9	0	2	3	5	5.5	2	40.0
0.25mg/ml	93	38	20	21.5	62.4	4	2	10	16	17.2	10	62.5
0.25mg/ml	91	26	16	17.6	46.2	2	3	10	15	16.5	6	40.0
Total/Avg	275	97	42	(15.3)	(50.5)	6	7	23	36	(13.1)	18	(50.0)
Bull B												
Control	91	15	35	38.5	54.9	3	3	8	14	15.4	9	64.3
Control	90	25	29	32.2	60.0	4	5	9	18	20.0	10	55.6
Control	92	20	33	35.9	57.6	7	6	12	25	27.2	15	60.0
Total/Avg	273	60	97	(35.5)	(57.5)	14	14	29	57	(20.9)	34	(59.6)
0.05mg/ml	90	18	40	44.4	64.4	2	4	13	19	21.1	9	47.4
0.05mg/ml	92	23	27	29.3	54.3	4	2	9	15	16.3	7	46.7
0.05mg/ml	93	22	27	29.0	52.7	5	3	13	21	22.6	8	38.1
Total/Avg	275	63	94	(34.2)	(57.1)	11	9	35	55	(20.0)	24	(43.6)
0.15mg/ml	96	21	38	39.6	61.5	6	7	10	23	24.0	17	73.9
0.15mg/ml	93	32	14	15.1	49.5	2	3	6	11	11.8	6	54.5
0.15mg/ml	100	21	29	29.0	50.0	4	4	14	22	22.0	9	40.9
Total/Avg	289	74	81	(28.0)	(53.6)	12	14	30	56	(19.4)	32	(57.1)

0.25mg/ml	92	24	34	37.0	63.0	5	3	11	19	20.7	14	73.7
0.25mg/ml	96	31	23	24.0	56.3	1	3	3	7	7.3	5	71.4
Total/Avg	188	55	57	(30.3)	(59.6)	6	6	14	26	(13.8)	19	(73.1)

Example 5

A similar experiment as done in Example 4 was done to test the effect of OSR treated sperm cells on the development of eggs fertilized using a higher concentration of the antioxidant, comparing it to one of the earlier used concentrations. Semen samples from two bulls of different breeds (one Holstein; one Jersey) were sex sorted using flow cytometry, again using vitamin B12 as the antioxidant, present at equal concentrations during staining, in the catch fluid of the collecting vessel and in the cryoprotectant extender prior to freezing the sex sorted sample (3 step). For each bull, the two concentrations of vitamin B12 tested were: 0.5mg/ml and 0.25mg/ml. The control samples were not treated with vitamin B12. All experimental steps were done the same as in Example 4. The results are shown in Table 5 below.

TABLE 5: IVF - Embryo Fertilization (3 step)

	Zyg	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Total Embs	Blast %	Hatch #	Hatch %
Bull A (Holstein)												
Control	91	25	35	38.5	65.9	3	2	4	9	9.9	3	33.3
Control	93	40	19	20.4	63.4		1	2	3	3.2	0	0.0
Control	98	25	25	25.5	51.0	3	6	5	14	14.3	6	42.9
Total/Avg	282	90	79	28.0	(60.1)	6	9	11	26	(9.2)	9	(34.6)
0.25mg/ml	97	25	39	40.2	66.0	6	9	5	20	20.6	8	40.0
0.25mg/ml	97	34	30	30.9	66.0	5	6	5	16	16.5	4	25.0
0.25mg/ml	97	23	33	34.0	57.7	6	7	6	19	19.6	9	47.4
Total/Avg	291	82	102	35.1	(63.2)	17	22	16	55	(18.9)	21	(38.2)
0.5mg/ml	94	25	34	36.2	62.8	0	3	3	6	6.4	1	16.7
0.5mg/ml	95	29	30	31.6	62.1	1	7	7	15	15.8	4	26.7
0.5mg/ml	93	18	35	37.6	57.0	5	7	8	20	21.5	11	55.0
Total/Avg	282	72	99	35.1	(60.6)	6	17	18	41	(14.5)	16	(39.0)
Bull B (Jersey)												
Control	97	39	39	40.2	80.4	5	5	3	13	13.4	7	53.8
Control	100	22	12	12.0	34.0	4	5		9	9.0	2	22.2
Control	100	22	29	29.0	51.0	2	5	1	8	8.0	3	37.5

Total/Avg	297	83	80	26.9	(55.1)	11	15	4	30	(10.1)	12	(40.0)
0.25mg/ml	94	25	45	47.9	74.5	5	9	4	18	19.1	12	66.7
0.25mg/ml	99	36	20	20.2	56.6	7	6	6	19	19.2	6	31.6
0.25mg/ml	99	17	46	46.5	63.6	5	7	8	20	20.2	9	45.0
Total/Avg	292	78	111	38.0	(64.8)	17	22	18	57	(19.5)	27	(47.4)
0.5mg/ml	100	40	34	34.0	74.0	4	6	1	11	11.0	5	45.5
0.5mg/ml	95	31	24	25.3	57.9	5	11	7	23	24.2	6	26.1
0.5mg/ml	99	15	46	46.5	61.6	8	5	5	18	18.2	9	50.0
Total/Avg	294	86	104	35.4	(64.5)	17	22	13	52	(17.7)	20	(38.5)

Example 6

Another experiment similar to Examples 4 and 5 was performed to test the reproducible effect of OSR treated sperm cells regarding a single bull by monitoring the development of embryos. Bull A (Holstein) was sampled three different times; Bull B was sampled five different times; Bull C only one time; all semen samples were subjected to standard sex sorting procedures using flow cytometry with vitamin B12 as the OSR at 0.25 mg/ml during the steps of staining, collection in the catch fluid and prior to cryopreservation (3 step). The control samples were not treated with vitamin B12. All experimental steps were done the same as in Example 4. The results are provided in Table 6, below.

TABLE 6: IVF (3 step) - Reproducibility

Bull A (Holstein)	Zyg	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Total Embs	Blast %	Freeze %	Hatch %
Trial 1												
Control	507	85	119	23.5	40.2	34	19	31	84	16.6	10.5	
0.25mg/ml	434	92	100	23.0	44.2	27	14	44	85	(19.6)	9.4	
Trial 2												
Control	993	238	287	28.9	52.9	54	26	86	166	16.7	8.1	
0.25mg/ml	884	204	222	25.1	48.2	81	36	128	245	(27.7)	13.2	
Trial 3												
Control	907	209	215	23.7	46.7	70	27	90	187	20.6	10.7	
0.25mg/ml	1053	230	285	27.1	48.9	83	39	129	251	(23.8)	11.6	
Average - Control										(18.2)	(9.6)	
Average - 0.25 mg/ml										(24.5)	(11.8)	

Bull B (Holstein)	Zyg	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Total Embs	Blast %	Freeze %	Hatch %
Trial 1												
Control	507	85	119	23.5	40.2	34	19	31	84	16.6	10.5	
0.25mg/ml	434	92	100	23.0	44.2	27	14	44	85	(19.6)	9.4	
Trial 2												
Control	993	238	287	28.9	52.9	54	26	86	166	16.7	8.1	
0.25mg/ml	884	204	222	25.1	48.2	81	36	128	245	(27.7)	13.2	
Trial 3												
Control	907	209	215	23.7	46.7	70	27	90	187	20.6	10.7	
0.25mg/ml	1053	230	285	27.1	48.9	83	39	129	251	(23.8)	11.6	
Trial 4												
Control	550	122	177	32.2	54.4	12	19	56	87	15.8	5.6	
0.25mg/ml	595	124	183	30.8	51.6	12	8	52	72	(12.1)	3.4	
Trial 5												
Control	596	107	159	26.7	44.6	31	21	83	135	22.7	8.7	
0.25mg/ml	636	137	185	29.1	50.6	27	24	79	130	(20.4)	8.0	
Average - Control										(18.5)	(8.8)	
Average - 0.25 mg/ml										(21.7)	(9.7)	

Bull C	Zyg	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Total Embs	Blast %	Freeze %	Hatch %
Trial 1												
Control	454	113	265	58.4	83.3	21	17	49	87	(19.2)	(8.4)	
0.25mg/ml	509	104	335	65.8	86.2	31	27	62	120	(23.6)	(11.4)	

Example 7

A larger scale experiment was done to further test the reproducibility similar to what was done in Examples 6 and 7, but testing five bulls each three separate times. Semen samples from five bulls were sampled and sex sorted using flow cytometry in accordance with the earlier procedures and treated with 0.25 mg/ml vitamin B12 as the OSR (3 step). The control samples were not treated with vitamin B12.

TABLE 7: Averaged Effect (Holstein and Jersey Mix)

	Zyg	4-2C	8C	8C%	% Clv	C1	C1-	C2	Total Embs	Blast %	Hatch #	Hatch %
Control-A1	993	238	287	28.9	52.9	54	26	86	166	16.7		
Control-A2	507	85	119	23.5	40.2	34	19	31	84	16.6		
Control-A3	907	209	215	23.7	46.7	70	27	90	187	20.6		
Control-B1	96	36	8	8.3	45.8	1	0	5	6	6.3	2	33.3
Control-B2	68	19	7	10.3	38.2	0	0	2	2	2.9	0	0.0
Control-B3	91	31	19	20.9	54.9	2	3	10	15	16.5	5	33.3
Control-C1	91	15	35	38.5	54.9	3	3	8	14	15.4	9	64.3
Control-C2	90	25	29	32.2	60.0	4	5	9	18	20.0	10	55.6
Control-C3	92	20	33	35.9	57.6	7	6	12	25	27.2	15	60.0
Control-D1	97	39	39	40.2	80.4	5	5	3	13	13.4	7	53.8
Control-D2	100	22	12	12.0	34.0	4	5		9	9.0	2	22.2
Control-D3	100	22	29	29.0	51.0	2	5	1	8	8.0	3	37.5
Control-E1	91	25	35	38.5	65.9	3	2	4	9	9.9	3	33.3
Control-E2	93	40	19	20.4	63.4		1	2	3	3.2	0	0.0
Control-E3	98	25	25	25.5	51.0	3	6	5	14	14.3	6	42.9
Total/Avg	3514	851	911	25.9	(50.1)	192	113	268	573	(16.3)	62	(10.8)
0.25 –A1	884	204	222	25.1	48.2	81	36	128	245	27.7		
0.25 –A2	434	92	100	23.0	44.2	27	14	44	85	19.6		
0.25 –A3	1053	230	285	27.1	48.9	83	39	129	251	23.8		
0.25 –B1	91	33	6	6.6	42.9	0	2	3	5	5.5	2	40.0
0.25 –B2	93	38	20	21.5	62.4	4	2	10	16	17.2	10	62.5
0.25 –B3	91	26	16	17.6	46.2	2	3	10	15	16.5	6	40.0
0.25 –C1	92	24	34	37.0	63.0	5	3	11	19	20.7	14	73.7
0.25 –C2	96	31	23	24.0	56.3	1	3	3	7	7.3	5	71.4
0.25 –C3												
0.25 –D1	94	25	45	47.9	74.5	5	9	4	18	19.1	12	66.7
0.25 –D2	99	36	20	20.2	56.6	7	6	6	19	19.2	6	31.6
0.25 –D3	99	17	46	46.5	63.6	5	7	8	20	20.2	9	45.0
0.25 –E1	97	25	39	40.2	66.0	6	9	5	20	20.6	8	40.0
0.25 –E2	97	34	30	30.9	66.0	5	6	5	16	16.5	4	25.0

0.25 –E3	97	23	33	34.0	57.7	6	7	6	19	19.6	9	47.4
Total/Avg	3417	838	919	26.9	(51.4)	237	146	372	755	(22.1)	85	(11.3)

Example 8

In an additional experiment, post-thaw motility and progressive motility were checked using CASA at 0, 3 and 5 hours after thawing sex sorted semen samples (sorted using flow cytometry) treated with vitamin B12 as the antioxidant. The OSR was not added to the control samples. The semen samples were derived from two Holstein bulls. 0.25 mg/ml concentration of vitamin B12 was added to the test samples during the staining step, the collecting step (in the catch fluid of the collecting vessel) and in the cryoprotectant extender prior to freezing the sample (3 step). The results are shown in Table 8 below.

TABLE 8: Post-Thaw Motility (3 step)

Bull A	Total cells	Motile (%)	Prog Mot (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
0 hr Post-Thaw:											
Bull A - Control	1884	77	53	107	81	211	9	23	76	40	
Bull A - Control	1275	74	51	99	75	198	9	24	77	41	90
Average		(76)	(52)	103	78	205	9	24	77	41	
Bull A – 0.25	1074	73	51	89	68	183	8	26	77	40	
Bull A – 0.25	1519	69	50	101	78	195	8	27	78	43	90
Average		(71)	(51)	95	73	189	8	27	78	42	
3 hr Post-Thaw:											
Bull A - Control	1064	48	3	38	29	76	6	14	77	40	56
Bull A - Control	683	53	7	44	36	80	5	17	84	46	63
Average		(50)	(5)	41	32.5	78	5.5	15.5	80.5	43	59.5
Bull A – 0.25	870	64	22	48	39	84	8	14	77	41	86
Bull A – 0.25	978	46	7	41	31	83	8	14	77	38	76
Average		(55)	(15)	45	35	84	8	14	77	40	81
5 hr Post-Thaw:											
Bull A - Control	903	40	8	14	11	25	3	7	14	9	52
Bull A - Control	517	15	1	12	10	18	2	10	17	18	60
Average		(27.5)	(4.5)	13	10.5	21.5	2.5	8.5	15.5	13.5	56
Bull A – 0.25	708	61	26	17	17	23	2	6	13	12	79

Bull A – 0.25	747	34	7	20	16	28	3	8	14	13	72
Average		(47.5)	(16.5)	18.5	16.5	25.5	2.5	7	13.5	12.5	75.5

Bull B	Total cells	Motile (%)	Prog Mot (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
0 hr Post-Thaw:											
Bull B - Control	1878	73	57	88	73	153	7	27	83	49	
Bull B - Control	1706	72	54	83	69	142	6	28	84	51	90
Average		(73)	(55.5)	85.5	71	148	7	28	84	50	
Bull B – 0.25	1804	79	58	85	70	145	6	28	83	51	
Bull B – 0.25	1150	79	54	81	67	143	6	29	84	51	90
Average		(79)	(56)	83	69	144	6	29	84	51	
3 hr Post-Thaw:											
Bull B - Control	666	30	10	39	25	80	8	16	66	33	60
Bull B - Control	670	50	12	45	37	85	6	16	82	44	72
Average		(50)	(11)	42	31	82.5	7	16	74	38.5	66
Bull B – 0.25	928	56	18	50	39	96	6	18	80	42	83
Bull B – 0.25	772	42	12	46	37	89	6	18	80	42	82
Average		(49)	(15)	48	38	93	6	18	80	42	82.5
5 hr Post-Thaw:											
Bull B - Control	539	0	0	40	16	52	0	26	40	31	46
Bull B - Control	609	0	0	35	26	44	0	71	75	39	61
Average		(0)	(0)	37.5	21	48	0	48.5	57.5	35	53.5
Bull B – 0.25	902	43	4	41	28	85	7	14	70	34	83
Bull B – 0.25	721	21	0	38	21	70	4	14	57	32	73
Average		(32)	(2)	39.5	24.5	77.5	5.5	14	63.5	33	78

Example 9

In an additional experiment, motility and progressive motility were checked at 0 hours and 3 hours after thawing sex sorted semen samples (sorted using flow cytometry) treated with the antioxidant, vitamin B12. The OSR was not added to the control sample. The semen samples were derived from two different breeds of bull, one a Holstein the other Texas Longhorn. 0.25 mg/ml concentration of vitamin B12 was added to the test samples either (i) during the staining step (1 step-stain); (ii) the staining step and the collecting step (in the catch fluid of the collecting vessel) (2 step-stain); (iii) in the staining step, the collecting step and the freezing step (in the

cryoprotectant extender prior to freezing the sample) (3 step) – Table 9 (A) for 3 hr, and (B) for 0 hr; or (iv) only prior to the cryopreservation step (1 step-freeze) – Table 9 (C) for 3 hr.

TABLE 9 (A): 3 hr Post-Thaw Motility (3 step; 2 step-stain; 1 step-stain)

Bull 1 (TL) 3 hr Post-Thaw	Total cells	Motile (%)	Prog Mot (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Control		(12)	(3)	42	35	77	3	19	83	46	23
3 step (+ + +)		42	25	55	47	101	5	23	84	48	73
2 step-stain (+ + -)		25	9	47	41	85	5	21	87	49	47
1 step-stain (+ - -)		37	23	56	47	84	5	16	85	57	52

Bull 2 (Jersey) 3 hr Post-Thaw	Total cells	Motile (%)	Prog Mot (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Control		(72)	(63)	70	59	108	5	19	85	56	72
3 step (+ + +)		75	70	81	74	124	5	22	88	58	80
2 step-stain (+ + -)		57	35	60	50	105	5	19	84	48	78
1 step-stain (+ - -)		47	32	59	49	98	5	19	84	51	71

Average	Total cells	Motile (%)	Prog Mot (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Avg - Control		(42)	(33)	56	47	92	4	19	84	51	48
3 step (+ + +)		58	47	68	60	112	5	23	86	53	77
2 step-stain (+ + -)		41	22	53	45	95	5	20	85	48	63
1 step-stain (+ - -)		42	28	57	48	91	5	18	85	54	61

TABLE 9 (B) – 0 hr Post-Thaw Motility (3 step; 2 step-stain; 1 step-stain)

Bull 1 (TL) 0 hr Post-Thaw	Total cells	Motile (%)	Prog Mot (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Control		(58.5)	(49.5)	93.5	81.0	161.5	7.0	26.0	86.5	52.5	
3 step (+ + +)		76	60	89.5	79.5	154.5	7.0	27.5	89.0	56.5	
2 step-stain (+ + -)		57	48	96.0	84.0	168.0	7.0	25.5	87.5	52.0	
1 step-stain (+ - -)		60.5	55	95.0	83.5	167.0	7.0	26.5	88.5	52.0	
Bull 2 (Jersey) 0 hr Post-Thaw	Total cells	Motile (%)	Prog Mot (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Control		(79)	(68)	105.0	89.0	179.0	7.0	26.0	86.0	53.0	
3 step (+ + +)		70	57.7	94.5	82.0	165.5	6.5	30.0	86.5	52.0	

2 step-stain (+ + -)		74	67	97.0	85.0	170.0	7.0	27.0	88.0	52.0	
1 step-stain (+ - -)		80	71	104.0	88.0	189.0	8.0	26.0	85.0	49.0	

TABLE 9 (C) – 3 hr Post-Thaw Motility (1 step-freeze)

Bull 3 3 hr Post-Thaw	Total Cells	Motile (%)	Prog Mot (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	PIA (%)
Control	418	20	0	38	26	67	14	12			63
Control	238	29	0	35	23	53	0	14			59
Avg - Control	656	(24.5)	(0)	36.5	24.5	60	7	13			61
1 step-freeze (- - +)	384	50	10	43	35	80	5	17			63
1 step-freeze (- - +)	385	59	17	48	40	86	5	19			83
1 step-freeze (- - +)	210	32	4	41	31	75	6	13			67
1 step-freeze (- - +)	301	45	11	45	33	81	6	13			85
Avg – 1 step-frz	1280	(46.5)	(10.5)	44.25	34.75	80.5	5.5	15.5			74.5

Example 10

An additional experiment was conducted to assess the pregnancy rate of female bovines inseminated with sorted sperm cell samples treated with an antioxidant. Semen samples from two bulls were sex sorted using the protocol described above. 0.25 mg/ml concentration of vitamin B12 was added to the test samples during the staining step, the collecting step (in the catch fluid of the collecting vessel) and the freezing step (3 step).

Frozen semen straws containing sex sorted sperm cell samples were thawed using standard procedures. An artificial insemination (AI) gun was warmed as needed to approach body temperature of the recipient, and a straw was placed in the barrel of the insemination gun. The sealed end of the straw was cut off and a plastic sheath was placed over the straw and gun for hygienic purposes. The female was previously placed in a restraining shoot for insemination. The gun was threaded through the vagina and cervix and semen distributed in the uterine body. 384 females were inseminated, each inseminated with a single sperm cell dose, and each dose containing 2.1 million sperm cells in 0.25 ml. Pregnancy checks were made 33-40 days post insemination with an ultrasound machine. The results are shown in Table 10 below.

TABLE 10: Pregnancies (3 step)

		Inseminations	Percent Pregnancy
Bull A	Control	87	32.8
	0.25mg/ml	100	35.6
Bull B	Control	99	30.9
	0.25mg/ml	98	27.0
Total/Average	Control	186	(31.9)
Total/Average	0.25mg/ml	198	(31.3)

Example 11

Additional pregnancy field trials were performed using the sex-sorted semen treated with vitamin B12 at 0.25 mg/ml added to the test samples during the staining step, the collecting step and again in the freezing step (3-step), as done in Example 10 was evaluated another time looking using semen from five different Holstein bulls. Each semen sample was split into control and vitamin B12 (0.25 mg/ml) treatment groups, and later inseminated into primiparous recipient heifers. Pregnancy checks were made 33-40 days post insemination using ultrasound. The results are shown in Table 11 below.

TABLE 11: Pregnancies (3 step)

	Antioxidant	Inseminations	Percent Pregnancy
Bull A	Control		27.9
	0.25 mg/ml		28.4
Bull B	Control		26.1
	0.25 mg/ml		28.0
Bull C	Control		32.8
	0.25 mg/ml		35.6
Bull D	Control		26.0
	0.25 mg/ml		30.7
Bull E	Control		50.0
	0.25 mg/ml		57.0
Total/Average	Control	499	(32.6)
Total/Average	0.25 mg/ml	374	(35.9)

Example 12

The levels of DNA fragmentation were also screened using a DNA fragmentation 'Halomax for animals' kit (Halotech DNA, sl, Madrid, Spain) to determine if there were any advantageous effects of using the antioxidants during the staining and processing of sex-sorted

sperm. Two different breeds of cattle, Jersey and Holstein, were examined using two different concentrations of antioxidant, 0.25 mg/ml and 0.5 mg/ml of vitamin B12 with the 3 step protocol adding the same concentration of OSR during cell staining, in the collection catch fluid and prior to cryopreservation. One of the bulls was used to evaluate the effect of addition or omission of OSR at one or more of the sperm sorting steps. Motility and the level of DNA fragmentation were both recorded. The results are shown in Table 12 below.

TABLE 12: DNA Fragmentation (1 step-stain, 2 step, 3 step)

	% Motility		% DNA Fragmentation		
	0 hr	3 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Bull A (Jersey)					
Control	57	17	1	1	1.7
0.25mg/ml	72	51	0.3	0.3	0.7
0.5mg/ml	60	42	0.3	0.7	1.3
Bull B (Holstein)					
Control	62	32	0.3	0.3	0.7
0.25mg/ml	67	32	0	0.3	0.3
0.5mg/ml	79	48	0.3	0.3	0.7

	% Motility		% DNA Fragmentation		
	0 hr	3 hr	0 hr	24 hr	48 hr
Bull C (Jersey)					
Trial 1					
Control	79	72	1	1	1
3 step (+ + +)	70	75	0	0.3	0.3
2 step-stain (+ + -)	74	57	0.3	1	1
1 step-stain (+ - -)	80	47	0.7	1	1.3
Trial 2					
Control	59	12	0.3	1.7	1.7
3 step (+ + +)	76	42	0.3	0.3	0.7
2 step-stain (+ + -)	57	25	0.3	0.7	0.7
1 step-stain (+ - -)	61	37	0.7	1	1

Example 13

The effect of OSR on motility was evaluated as a function of the concentration of the sex-sorted sperm in the frozen straw. Tests were performed using vitamin B12 as the OSR at three different concentrations of the antioxidant: 0.15 mg/ml; 0.25 mg/ml and 0.35 mg/ml; all were

added to the test samples during the staining step, the collecting step and again in the freezing step (3-step), as done in Example 8. Holstein sperm was evaluated at three sperm cell concentrations based upon total number of sperm per straw: 1 million sperm/straw; 2.1 million sperm/straw; and 5 million sperm/straw. Motility was recorded 3 hr post-thaw.

A Jersey sperm sample was also evaluated in the same manner using 0.15 mg/ml or 0.25 mg/ml vitamin B12 at each of the three stages (3 step), but only at the 2.1 million sperm/straw concentration. The results are shown in Table 13.

TABLE 13: Frozen Sperm Cell Concentration (3 step)

(Holstein)	Motile	Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
1M/straw										
Control	20	4	40	32	76	3	15	78	42	43
.15mg/ml	48	18	48	42	81	4	12	88	53	66
.25 mg/ml	48	29	55	47	92	4	22	87	53	58
.35 mg/ml	65	46	58	51	94	4	23	88	55	70
2.1M/straw										
Control	28	2	39	33	73	6	16	85	46	41
.15mg/ml	49	10	44	38	79	5	18	86	48	72
.25 mg/ml	48	18	46	40	81	5	20	87	50	76
.35 mg/ml	46	30	58	51	99	5	23	88	53	60
5M/straw										
Control	20	1	39	29	69	7	13	74	43	46
.25mg/ ml	24	2	41	28	69	7	14	70	42	68
.35mg/ ml	28	3	41	32	68	7	14	69	43	69
.5mg/ ml	14	3	43	30	71	6	15	70	43	50
(Jersey)										
2.1M/straw										
Control	25	2	37	28	55	2	11	76	52	53
.15mg/ml	25	4	42	35	75	6	15	84	47	63
.25mg/ml	48	20	51	43	87	5	20	85	50	78

Example 14

The effect of a different OSR on bovine sperm motility was evaluated after zero hour and a three hour post-thaw period. The OSR, α -tocopheryl, a form of Vitamin E, was purchased as

‘polyoxyethanyl- α -tocopheryl sebacate’ in a 15% stock solution (Aldrich). Tests were performed using α -tocopheryl as the OSR, at three different concentrations: 0.01 mg/ml; 0.1 mg/ml and 0.5 mg/ml; all were added to the test samples during the staining step, the collecting step and again in the freezing step (3-step), as done in the prior Examples. Sex-sorted Holstein sperm was evaluated using a standard sperm concentration of 2.1 million sperm/straw processed from three separate bulls. Motility of the treated samples were compared to untreated controls and recorded at 0 hr and 3 hr post-thaw.

TABLE 14: Motility with α -tocopheryl (vitamin E) (3 step)

	Total cells	Motile	Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Holstein										
0 hr Post-Thaw										
Bull A										
Control	548	56	25	75	52	151	7	22	74	39
0.01	617	72	17	100	49	201	10	20	56	27
0.1	458	73	33	99	62	217	9	22	66	32
0.5	424	63	36	97	68	214	9	22	72	34
Bull B										
Control	548	56	25	75	52	151	7	22	74	39
0.01	617	72	17	100	49	201	10	20	56	27
0.1	458	73	33	99	62	217	9	22	66	32
0.5	424	63	36	97	68	214	9	22	72	34
Bull C (1)										
Control	280	50	30	66	51	140	7	20	78	39
0.01	530	59	39	89	68	188	10	20	76	38
0.1	518	63	35	86	61	196	10	20	72	33
0.5	269	30	17	75	53	179	8	22	72	31
Bull C (2)										
Control	364	23	12	65	54	116	5	25	82	49
0.01	347	36	27	86	78	140	6	26	90	57
0.1	822	27	18	84	75	149	6	25	88	52
0.5	764	29	18	74	64	130	7	28	87	55
Holstein										
3 hr Post-Thaw										
A-toc	Total cells	Motile	Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Bull A										
Control	260	25	6	39	33	71	5	16	83	47

0.01	253	64	20	51	42	92	5	21	84	49
0.1	297	62	32	54	46	101	5	22	86	48
0.5	235	54	29	60	51	106	5	24	85	49
Bull B										
Control	309	29	8	46	37	83	6	19	82	46
0.01	126	28	9	54	39	103	4	21	76	41
0.1	154	14	4	56	36	100	6	18	73	38
0.5	151	36	10	57	41	104	5	22	77	44
Bull C (1)										
Control	200	14	2	40	33	77	5	18	83	44
0.01	222	19	3	41	38	60	4	29	93	70
0.1	155	15	5	49	41	94	7	21	84	45
0.5	82	26	13	50	44	89	5	18	87	50
Bull C (2)										
Control	207	2	0	19	15	26	1	11	73	27
0.01	270	6	0	35	21	55	0	13	60	39
0.1	658	4	0	38	29	63	1	8	76	46
0.5	278	2	0	37	21	64	0	14	55	33

Example 15

The effect of a third OSR on bovine sperm motility was evaluated after zero hour, three hour and six hour post-thaw periods. Alpha-ketoglutarate (AKG) was freshly made and used at three different concentrations: 0.25 mg/ml; 0.35 mg/ml and 0.45 mg/ml; all were added to the test samples during the staining step, the collecting step and again in the freezing step (3-step), as done in the prior Examples. Sex-sorted Holstein and Jersey bovine sperm were evaluated using a standard concentration of 2.1 M sperm/straw. Motility of the treated samples was compared to untreated controls at 0 hr, 3 hr and 6 hr post-thaw.

TABLE 15: Alpha-keto Glutarate (AKG) (3 step)

Holstein – 0 hr	Motile	Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	
control	41	16	69	44	143	8	21	66	34	
.25 mg/ ml	91	75	104	81	185	8	27	82	48	
.35 mg/ ml	80	65	94	80	165	7	29	85	51	
.45 mg/ ml	86	75	98	88	162	7	30	89	57	

Holstein - 3hr	Motile	Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
control	4	0	36	24	53	0	10	67	48	44
.25 mg/ ml	77	60	99	79	176	7	26	81	45	89
.35 mg/ ml	63	48	85	70	145	6	25	83	50	80

.45 mg/ ml	60	56	94	80	145	5	24	85	56	80
------------	----	----	----	----	-----	---	----	----	----	----

Holstein - 3 hr	Motile	Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
control	30	7	40	30	68	3	13	74	46	44
.25 mg/ ml	71	55	96	77	169	6	26	81	47	89
.35 mg/ ml	64	38	69	57	117	5	21	84	50	80
.45 mg/ ml	60	50	90	75	144	6	25	84	53	80

Holstein - 6 hr	Motile	Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
control	4	0	38	23	55	0	12	61	42	56
.25 mg/ ml	36	7	44	33	87	6	17	76	39	73
.35 mg/ ml	58	7	42	32	80	7	16	76	40	85
.45 mg/ ml	52	22	55	46	96	5	22	82	48	79

Holstein - 6 hr	Motile	Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
control	4	0	38	23	55	0	12	61	42	56
.25 mg/ ml	36	7	44	33	87	6	17	76	39	73
.35 mg/ ml	58	7	42	32	80	7	16	76	40	85
.45 mg/ ml	52	22	55	46	96	5	22	82	48	79

Jersey - 0 hr	Motile	Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
control	72	60	82	72	141	6	25	87	53
.25 mg/ ml	67	51	83	68	152	7	24	83	48
.35 mg/ ml	57	43	79	63	146	6	25	82	47
.45 mg/ ml	81	66	81	70	133	6	27	87	56

Jersey - 3 hr	Motile	Prog	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	PIA
control	13	1	36	24	65	2	14	66	38	42
.25 mg/ ml	33	16	65	49	117	5	24	79	46	62
.35 mg/ ml	26	10	59	46	110	6	25	80	45	54
.45 mg/ ml	59	25	67	50	66	6	25	78	45	71

Example 16

The effect of combining two antioxidants on bovine sperm motility was evaluated after zero hour, three hour and six hour post-thaw periods. Vitamin B12 was used at 0.25 mg/ml and fresh alpha-ketoglutarate (AKG) was used at 0.35 mg/ml. Either vitamin B12 or AKG or both treatments were added at the designated concentrations during the staining step, the collecting step and again in the freezing step (3-step), as done earlier. Sex-sorted sperm from three Jersey bulls were evaluated using standard 2.1 M sperm/straw. Motility of the treated samples was compared to untreated controls at 0 hr, 3 hr and 6 hr post-thaw.

TABLE 16: Combination AKG, Vitamin B12, and Combination (3 step)

Jersey 1 - 0hr	Motile	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Control	75	67	99	87	162	6	30	88	56
B12 - 0.25 mg/ml	88	78	97	87	157	6	33	89	58
AKG - 0.35 mg/ml	87	75	93	81	148	6	31	88	57
COMBO	78	69	93	83	149	6	32	89	57

Jersey 1 - 3hr	Motile	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Control	43	5	41	33	74	6	15	56	46
B12 - 0.25 mg/ml	53	34	58	51	93	4	23	87	55
AKG - 0.35 mg/ml	60	44	82	67	136	5	27	83	50
COMBO	51	36	79	63	129	5	25	80	50

Jersey 1 - 6hr	Motile	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Control	2	1	48	38	58	3	8	75	64
B12 - 0.25 mg/ml	37	2	38	28	61	4	15	73	48
AKG - 0.35 mg/ml	36	18	50	42	90	4	22	82	46
COMBO	35	6	45	34	81	5	17	76	43

Jersey 2 - 3hr	Motile	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Control	18	1	35	22	57	5	13	61	38
B12 - 0.25 mg/ml	66	30	51	43	93	5	18	84	47
AKG - 0.35 mg/ml	64	50	78	62	117	5	19	82	56
COMBO	50	38	72	57	124	5	24	80	48

Jersey 2 - 6hr	Motile	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Control	1	0	16	16	35	0	0	50	23
B12 - 0.25 mg/ml	24	1	36	24	51	1	17	65	47
AKG - 0.35 mg/ml	44	5	42	36	68	2	17	86	54
COMBO	46	18	61	46	111	5	21	77	44

Jersey 3 - 0hr									
Control	80	60	100	80	186	8	26	81	46
B12 - 0.25 mg/ml	83	70	89	76	160	7	27	85	51
AKG - 0.35 mg/ml	86	73	95	82	170	7	27	85	50
COMBO	89	74	99	81	177	7	28	84	49

Jersey 3 - 3hr	Motile	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Control	64	22	47	38	88	6	16	81	45
B12 - 0.25 mg/ml	73	52	64	52	104	10	20	81	51

AKG - 0.35 mg/ml	80	44	69	53	118	6	19	79	47
COMBO	77	30	56	44	107	7	19	79	42

Jersey 3 - 6hr	Motile	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Control	16	0.5	38	24	54	1	17	64	47
B12 - 0.25 mg/ml	44	1	37	24	56	3	14	66	44
AKG - 0.35 mg/ml	79	11	46	33	84	6	15	74	41
COMBO	72	12	49	34	98	8	16	71	35

Example 17

In an additional experiment, motility and progressive motility of female and male sex-sorted Deer sperm were checked at 0, 1 and 3 hours after thawing the sex sorted semen samples that were treated with the antioxidant, vitamin B12 at two concentrations: 0.25 mg/ml and 0.35 mg/ml; all samples were treated during staining, catch and prior to cryopreservation (3 step). The OSR was not added to the control sample. The semen samples were derived from two white tailed bucks. Each sample was sorted for both male and female enriched populations of sperm.

TABLE 17: Deer (male and female) – Vitamin B12 (3 step)

0 HR	FEMALE	TOTAL	MOTILE	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR
Buck A	CONTROL	1887	74	53	85	67	157	7	24	78
	0.25	2803	82	53	83	62	157	7	24	74
	0.35	2484	84	55	92	68	169	7	24	74
	MALE									
	CONTROL	2939	81	55	94	70	178	7	24	76
	0.25	3036	76	49	91	66	173	7	24	73
	0.35	2448	86	54	98	71	181	8	24	73
Buck B	FEMALE									
	CONTROL	2025	80	36	92	56	185	8	22	64
	0.25	1531	82	40	91	56	179	7	22	65
	0.35	1859	89	43	105	69	198	8	23	66
	MALE									
	CONTROL	2114	85	39	103	62	202	8	22	63
	0.25	1169	81	35	109	63	219	8	23	61
	0.35	1658	89	46	103	67	197	8	23	66

1 HR	FEMALE	TOTAL	MOTILE	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR
Buck A	CONTROL	1286	64	29	86	57	170	8	21	68
	0.25	1380	78	41	97	64	185	8	21	67
	0.35	1808	80	31	109	68	216	9	22	63

	MALE		MOTILE	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR
	CONTROL	1612	67	27	71	50	141	7	22	73
	0.25	1817	57	23	64	45	125	7	22	70
	0.35	3169	85	52	105	75	198	8	23	72
	FEMALE		MOTILE	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR
	CONTROL	1371	81	26	65	43	127	6	19	68
	0.25	1541	83	28	84	51	158	8	19	64
	0.35	2637	92	32	116	66	214	9	20	58
	MALE									
	CONTROL	1520	84	48	86	57	169	6	23	70
	0.25	1086	84	46	104	66	203	8	22	67
	0.35	1881	92	46	112	71	216	8	22	65

2 HR	FEMALE	TOTAL	MOTILE	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR
	CONTROL	1188	58	16	58	42	114	7	18	74
	0.25	1045	75	40	97	65	190	9	20	68
	0.35	877	54	19	68	50	137	8	20	75
	MALE									
	CONTROL	1325	59	13	51	38	101	6	19	77
	0.25	1523	56	24	66	46	130	6	22	70
	0.35	1797	58	39	101	75	193	8	23	76
	FEMALE		MOTILE	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR
	CONTROL	1125	73	15	56	38	111	7	18	69
	0.25	834	64	11	53	36	106	7	16	68
	0.35	1378	85	26	100	57	190	8	19	60
	MALE									
	CONTROL	1603	77	37	66	46	126	6	19	73
	0.25	866	78	47	95	67	177	7	21	71
	0.35	1760	89	41	78	51	149	7	20	70

* * * * *

As can be easily understood from the foregoing, the basic concepts of the present invention may be embodied in a variety of ways. As such, the particular embodiments, elements, terms, or expressions disclosed by the description, or shown in the figures accompanying this application are not intended to be limiting, but rather are examples of the numerous and varied embodiments generically encompassed by the invention or its equivalents with respect to any particular element thereof. In addition, the specific description of a single embodiment or

element of the invention may not explicitly describe all embodiments or elements possible; many alternatives are implicitly disclosed by the description and figures.

It should be understood that each element of an apparatus or each step of a method may be described by an apparatus term or method term. Such terms can be substituted where desired to make explicit the implicitly broad coverage to which this invention is entitled. As example, it should be understood that all steps of a method may be disclosed as an action, a means for taking that action, or as an element which causes that action. Similarly, each element of an apparatus may be disclosed as the physical element or the action which that physical element facilitates. As another example, the disclosure of a “sorter” should be understood to encompass disclosure of the act of “sorting,” whether explicitly discussed or not, and conversely, effective disclosure of the act of “sorting” should be understood to encompass disclosure of a “sorter.” Such alternative terms for each element or step are to be understood to be explicitly included in the description.

In addition, it should be understood that unless utilization of a specific term in this application is inconsistent with common use and interpretation of that term, dictionary definitions should be understood to be included in the description for each term as contained in the Random House Webster’s Unabridged Dictionary, second edition, each definition hereby incorporated by reference.

Moreover, for the purposes of the present invention, the term “a” or “an” before an item also refers to one or more of that item; for example, “a container” refers to one or more of the containers. As such, the terms “a” or “an”, “one or more” and “at least one” can be used interchangeably herein. Further, as used herein the term “or” means “and/or” unless specifically indicated otherwise.

The background section of this patent application provides a statement of the field of endeavor to which the invention pertains. This section may also incorporate or contain paraphrasing of certain United States patents, patent applications, publications, or subject matter of the claimed invention useful in relating information, problems, or concerns about the state of technology to which the invention is drawn toward. It is not intended that any United States patent, patent application, publication, statement or other information cited or incorporated herein be interpreted, construed or deemed to be admitted as prior art with respect to the present invention, and the terms used in those earlier documents which may be similarly used in this

disclosure, shall not alter the intended definition of those same terms as defined or intended herein.

The claims set forth in this specification, if any, are hereby incorporated by reference as part of the description of the current invention, and the applicant expressly reserves the right to use all or a portion of such incorporated content as additional description to support any or all of the claims or any element or component thereof. The applicant further expressly reserves the right to move any portion or all of the incorporated content of such claims or any element or component thereof from the description into the claims, or vice versa, as necessary to define the invention for which protection is sought by this application or by any subsequent application or continuation, division, or continuation-in-part application thereof, or to obtain any benefit for reduction in fees in compliance with relevant patent laws, rules, or regulations of any country or treaty, and such incorporated content shall survive the entire pendency of this application as well as any subsequent continuation, division, continuation-in-part application filings or any reissue or extension thereof.

The claims set forth in this specification are intended to describe the metes and bounds of a limited number of the preferred embodiments of the invention and are not to be construed as the broadest embodiment of the invention or a complete listing of embodiments of the invention that may be claimed. The applicant does not waive any right to develop further claims based upon the description set forth above as a part of any continuation, division, or continuation-in-part, or similar application.

Claims:

1. A method of treating sperm cells during processing to improve cell integrity comprising the steps of:
 - a. providing a sperm cell sample;
 - b. processing the sperm cell sample; and
 - c. adding one or more OSRs in the concentration range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml to the sperm cell sample to form a sperm cell composition.
2. The method as claimed in claim 1, further comprising the step of holding the sperm cell composition at a holding temperature without freezing for a period of time in the range of about 2 seconds to about a week following addition of the one or more OSRs.
3. The method as claimed in claim 2, wherein the holding period is selected from a range selected from the group of: about 2 sec to about 3 min; about 3 min to about 15 min; about 15 min to about 1 hr; about 1 hr to about 8 hrs; about 8 hrs to about 12 hrs; about 12 hrs to about 18 hrs; about 8 hrs to about 24 hrs; about 24 hrs to about 48 hrs; about 48 hrs to about 72 hrs; about 72 hrs to about 96 hrs; about 96 hrs to about 120 hrs; about 120 hrs to about 144 hrs; and about 144 hrs to about 168 hrs.
4. The method of claim 2, wherein the holding temperature is in the range of 4°C and 39°C.
5. The method of claim 4, wherein the holding temperature is in the range of about 4°C to 16°C.
6. A method of transporting processed sperm cells comprising the steps of:
 - a. forming a sperm cell composition according to any one of claims 1-5; and
 - b. transporting the sperm cell composition to a second location.
7. The method as claimed in claim 1, wherein processing the sperm cell sample comprises two or more processing steps selected from the group of: collecting a semen sample; holding; transporting; buffering; chilling; warming; staining; diluting; concentrating; exciting with a laser; electronic charging; deflecting; ablating; sorting; collecting; shaking; oscillating; magnetically separating; oxygenating; labeling; precipitating; centrifuging; resuspending; mixing; dialyzing; cryostabilizing; freezing; thawing; vitrifying; culturing; inseminating; microinjecting; microfluidic processing; microchip processing; jet and air processing; flow cytometry processing; and similar handling techniques.
8. The method as claimed in claim 1, wherein processing comprises a multistep sperm sorting procedure resulting in the collection of one or more enriched sperm cell subpopulations.

9. The method as claimed in claim 8, wherein the sorting procedure includes the step of staining the sperm with a DNA selective dye.
10. The method as claimed in claim 8, wherein the subpopulations comprise at least one gender enriched subpopulation of sperm cells.
11. The method as claimed in claim 8, wherein the sorting procedure includes at least one processing step at a temperature selected from the group consisting of: 5°C to 15°C; 15°C to 20°C; 20°C to 25°C; 25°C to 30°C; 30°C to 35°C; 35°C to 40°C and 40°C to 45°C.
12. The method as claimed in claim 8, wherein the sorting procedure comprises the step of adding an extender to the sperm cell sample or the sperm cell composition, wherein the pH of the extender is in the range of pH 5.5 to pH 7.8.
13. The method as claimed in claim 12, wherein the pH is selected from the group of: about 5.5; about 5.6; about 5.7; about 5.8; about 5.9; about 6.0; about 6.1; about 6.2; about 6.3; about 6.4; about 6.5; about 6.6; about 6.7; about 6.8; about 6.9; about 7.0; about 7.1; about 7.2; about 7.3; about 7.4; about 7.5; about 7.6; about 7.7; and about 7.8.
14. The method as claimed in any one of claims 1-13, wherein the sperm cell sample has been frozen and thawed prior to being further processed.
15. The method as claimed in any one of claims 1-14, wherein the method further comprises the step of freezing the sperm cell composition to form a frozen sperm cell composition.
16. The method as claimed in claim 15, wherein the method further comprises the step of thawing the frozen sperm cell composition.
17. A method of producing an embryo, comprising: forming a sperm cell composition as claimed in claim 1, and using the sperm cell composition for assisted reproductive techniques.
18. The method of producing an embryo according to the method of claim 17, wherein the assisted reproductive technique (ART) is selected from the group consisting of: in vitro fertilization (IVF), artificial insemination (AI), intracytoplasmic sperm injection (ICSI), multiple ovulation and embryo transfer (MOET), and other embryo transfer techniques.
19. The method of producing an embryo according to the method of claim 17, wherein the assisted reproductive technique is in vitro fertilization (IVF) or multiple ovulation and embryo transfer (MOET).
20. The method as claimed in any one of claims 1-19, wherein the OSRs are selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione

peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers), tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.

21. The method as claimed in claim 20, wherein the OSRs are selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.

22. The method as claimed in claim 20, wherein the one or more OSRs are added to the sperm cell composition at any given step whereby the added OSR is added to be in the range of 0.01 to 5.0 mg/ml in the sperm cell composition.

23. The method as claimed in claim 21, wherein the concentration of the added OSR is selected from the group of: 0.01 to 5.0 mg/ml; 0.01 to 0.25 mg/ml; 0.01 to 0.5 mg/ml; 0.01 to 1 mg/ml; 0.01 to 2.5 mg/ml; 0.01 to 5 mg/ml; 0.05 to 0.1 mg/ml; 0.05 to 1.0 mg/ml; 0.05 to 2.5 mg/ml; 0.1 to 0.25 mg/ml; 0.1 to 0.5 mg/ml; 0.1 to 1 mg/ml; 0.1 to 2.5 mg/ml; 0.1 to 5 mg/ml; 0.15 to 0.45 mg/ml; 0.15 to 0.5 mg/ml; 0.25 to 0.35 mg/ml; 0.25 to 0.5 mg/ml; 0.25 to 1 mg/ml; 0.25 to 2.5 mg/ml; 0.25 to 5 mg/ml; 0.35 to 0.5 mg/ml; 0.35 to 1 mg/ml; 0.35 to 2.5 mg/ml; 0.35 to 5 mg/ml; 0.5 to 1 mg/ml; 0.5 to 2.5 mg/ml; 0.5 to 5 mg/ml; 1 to 2.5 mg/ml; and 1 to 5 mg/ml.

24. The method as claimed in claim 23, wherein the concentration of the added OSR is selected from the group of: about 0.05 mg/ml; about 0.1 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.45 mg/ml; and about 0.5 mg/ml.

25. The method as claimed in claim 24, wherein the concentration of the added OSR is about 0.15 mg/ml, about 0.25 mg/ml or about 0.35 mg/ml.

26. The method as claimed in any one of claims 1-25, wherein processing constitutes two or more processing steps and wherein the OSR is added at one or more of the processing steps.

27. A stress reducing media comprising at least one OSR at the appropriate stock concentration to be present in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml in the sperm cell composition at the time of processing.

28. The stress reducing media as claimed in claim 27, for sorting sperm cells comprising one or more of the following buffers selected from the group of: Tris, TES, HEPES, TALP, TCA, PBS, citrate, milk and derivatives thereof.

29. The sperm sorting stress reducing media as claimed in claim 27 or 28, wherein the OSR is selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers), tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.

30. The sperm sorting stress reducing media as claimed in claim 29, wherein the OSR is selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.

31. A method of sorting a sperm cell sample to form one or more subpopulations comprising the steps of:

- a. providing a sperm cell sample;
- b. sorting the sperm cell sample to form one or more subpopulations; and
- c. adding at least one OSR to the sperm cell sample, during one or more of the processing steps, the concentration of the OSR added to the sperm cell sample being in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml.

32. The method as claimed in claim 31, wherein the method further comprises the step of staining the sperm cell sample with a DNA selective dye to form a stained sperm cell sample.

33. The method as claimed in claim 31 or 32, wherein the one or more subpopulations comprises at least one gender enriched population of X-chromosome bearing or Y-chromosome bearing sperm cells having a DNA selective dye associated with their DNA.

34. The method as claimed in claim 31, wherein the OSR is selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers), tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.

35. The method as claimed in claim 34, wherein the OSR is selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.

36. The method as claimed in any one of claims 31-35, wherein the method further comprises the step of freezing the one or more subpopulations.

37. The method as claimed in claim 36, wherein the method further comprises the step of thawing the frozen gender enriched population of X-chromosome bearing or Y-chromosome bearing sperm cells and using it for ART.

38. The method as claimed in claim 31, wherein the method further comprises the step of allowing a time period to elapse after the addition of the antioxidant, the time period being in the range of about 3 seconds to about 72 hours.

39. The method as claimed in claim 38, wherein the time period is selected from the group consisting of about 3 seconds to about 3 hours; about 3 hours to about 6 hours; about 6 hours to about 12 hours; about 12 hours to about 18 hours; about 18 hours to about 24 hours; about 24 hours to about 36 hours; about 36 hours to about 48 hours; about 48 hours to about 60 hours; and about 60 hours to about 72 hours.

40. The method of claim 39, wherein the concentration of the added OSR is in the range of 0.05 to 0.5 mg/ml in the sperm cell sample.

41. The method as claimed in claim 31, wherein the concentration of the added OSR is selected from the group of: about 0.05 mg/ml; about 0.1 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.45 mg/ml; and about 0.5 mg/ml.

42. The method as claimed in claim 31, wherein the method further comprises the step of adding a buffer, a media and/or an extender to the sperm cell sample wherein the buffer, media and/or extender is in a pH range of 6.5 to 7.5.

43. The method as claimed in claim 42, wherein the pH is selected from the group consisting of about 6.5; about 6.6; about 6.7; about 6.8; about 6.9; about 7.0; about 7.1; about 7.2; about 7.3; about 7.4; and about 7.5.

44. The method as claimed in claim 31, wherein at least one of the processing steps is carried out within a temperature range selected from the group consisting of about 5°C to about 15°C; about 15°C to about 20°C; about 20°C to about 25°C; about 25°C to about 30°C; about 30°C to about 35°C; about 35°C to about 40°C and about 40°C to about 45°C.

45. The method as claimed in any one of claims 31-44, wherein the sperm cell sample is a frozen thawed sperm cell sample.

46. A method of sorting a sperm cell sample comprising the steps of:

- a. providing a sperm cell sample;
- b. staining the sperm cell sample with a first media;
- c. sorting the sperm cell sample to form at least one subpopulation contained in a second media; and
- d. freezing the at least one subpopulation in a third media;

wherein at least one of the first media, the second media or the third media contains at least one OSR at a final processing concentration in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml.

47. The method of claim 46, wherein the OSR is selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers), tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.

48. The method as claimed in claim 47, wherein the OSR is selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.

49. The method of claim 47, wherein the concentration of the added OSR is in the range of 0.05 to 0.5 mg/ml in the sperm cell sample.

50. The method of claim 49, wherein the concentration of the added OSR is selected from the group of: about 0.05 mg/ml; about 0.1 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.45 mg/ml; and about 0.5 mg/ml.

51. The method of any one of claims 46-50, wherein the at least one OSR is added to: the first media, or the second media, or the third media.

52. The method of any one of claims 46-50, wherein the at least one OSR is added to: the first media and the second media, or the first and third media, or the second and third media.

53. The method of any one of claims 46-50, wherein the at least one OSR is added to: the first media, and the second media, and the third media.

54. The method of any one of claims 1-26 or 31-53, wherein the sperm cell sample is derived from a human, bovine, swine, ovine, equine, deer, elk, buffalo, canine, feline, chimpanzee, gorilla, whale, dolphin and other marine mammals.

55. A method of sorting a sperm cell sample comprising the steps of:

- a. providing a sperm cell sample;
- b. staining the sperm cell sample with a first media; and
- c. sorting the sperm cell sample to form at least one subpopulation contained in a second media;

wherein at least one of the first media or the second media contains at least one OSR at a final processing concentration in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml.

56. The method of claim 55, wherein the OSR is selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers), tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.

57. The method as claimed in claim 56, wherein the OSR is selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.

58. The method of claim 56, wherein the concentration of the added OSR is in the range of 0.05 to 0.5 mg/ml in the sperm cell sample.

59. The method of claim 56, wherein the concentration of the added OSR is selected from the group of: about 0.05 mg/ml; about 0.1 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.45 mg/ml; and about 0.5 mg/ml.

60. The method of any one of claims 55-59, wherein the at least one OSR is added to the first media or the second media.

61. The method of any one of claims 55-59, wherein the at least one OSR is added to both the first media and the second media.

62. The method of any one of claims 55-61, wherein the sperm cell sample is derived from a human, bovine, swine, ovine, equine, deer, elk, buffalo, canine, feline, chimpanzee, gorilla, whale, dolphin and other marine mammals.

63. A processed sperm sample comprising a sperm cell sample that has been subjected to one or more processing steps and contains one or more OSRs in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml.
64. The processed sperm sample as claimed in claim 63, wherein the OSR is selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers), tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.
65. The processed sperm sample as claimed in claim 64, wherein the OSR is selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocoperyl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.
66. The processed sperm sample of any one of claims 63-65, wherein the sperm cell sample has been sorted.
67. The processed sperm sample of claim 66, wherein the sperm cell sample has been gender sorted.
68. The processed sperm sample of any one of claims 63-67, wherein the sperm cell sample is unfrozen.
69. The processed sperm sample of any one of claims 63-67, wherein the sperm cell sample is frozen.
70. The processed sperm sample of any one of claims 63-69, wherein the sperm cell sample is derived from a human, bovine, swine, ovine, equine, deer, elk, buffalo, canine, feline, chimpanzee, gorilla, whale, dolphin and other marine mammals.
71. A method of fertilizing one or more eggs, comprising the steps of:
- providing a sperm cell sample in a media making a sperm cell composition, wherein the media contains one or more OSRs having a concentration appropriate for making a sperm cell composition having an OSR concentration in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml; and
 - mixing the one or more eggs with the sperm cell sample to form a sperm cell composition.
72. The method of claim 71, wherein the OSR is selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate,

mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers), tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.

73. The method as claimed in claim 72, wherein the OSR is selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.

74. The method of claim 72, wherein the concentration of the added OSR is in the range of 0.05 to 0.5 mg/ml in the sperm cell composition.

75. The method of claim 72, wherein the concentration of the added OSR is selected from the group of: about 0.05 mg/ml; about 0.1 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.45 mg/ml; and about 0.5 mg/ml.

76. The method of any one of claims 71-75, wherein the sperm cell composition has been sorted.

77. The method of claim 76, wherein the sperm cell composition has been gender sorted.

78. The method of any one of claims 1-13, 15-26, 31-44, 46-54, or 71-77, wherein the sperm cell sample is unfrozen.

79. The method of any one of claims 15-26, 46-54, 55-62, or 71-77, wherein the sperm cell sample is frozen.

80. The method of any one of claims 71-77, wherein the sperm cell sample is derived from a human, bovine, swine, ovine, equine, deer, elk, buffalo, canine, feline, chimpanzee, gorilla, whale, dolphin and other marine mammals.

81. An embryo produced by the method comprising the steps of:

- a. providing a sperm cell sample in a media, wherein the media contains at least one OSR having a concentration in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml; and
- b. mixing the one or more eggs with the sperm cell sample to produce an embryo.

82. The embryo as claimed in claim 81, wherein the OSR is selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers),

tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.

83. The embryo as claimed in claim 82, wherein the OSR is selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.

84. The embryo of claim 81, wherein the concentration of the added OSR is in the range of 0.05 to 0.5 mg/ml in the sperm cell sample.

85. The embryo of claim 81, wherein the concentration of the added OSR is selected from the group of: about 0.05 mg/ml; about 0.1 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.45 mg/ml; and about 0.5 mg/ml.

86. The embryo of any one of claims 81-85, wherein the sperm cell sample has been sorted.

87. The embryo of claim 86, wherein the sperm cell sample has been gender sorted.

88. The embryo of any one of claims 81-87, wherein the sperm cell sample is unfrozen.

89. The embryo of any one of claims 81-87, wherein the sperm cell sample is frozen.

90. The embryo of any one of claims 81-89, wherein the sperm cell sample is derived from a human, bovine, swine, ovine, equine, deer, elk, buffalo, canine, feline, chimpanzee, gorilla, whale, dolphin and other marine mammals.

91. A method of fertilizing one or more eggs comprising the steps of:

- a. providing a sperm cell sample;
- b. adding a first media;
- c. staining the sperm cell sample in the first media;
- d. sorting the sperm cell sample to form one or more subpopulations of sperm cells;
- e. collecting the subpopulation of sperm cells in a second media;
- f. mixing the subpopulation of sperm cells with one or more eggs to fertilize one or more of the eggs;

wherein the first media and/or the second media contains at least one OSR in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml, and wherein the OSR containing media may be prepared before addition to the sperm cell sample or by addition of an OSR stock solution to the sperm cell sample solution.

92. A method of fertilizing one or more eggs comprising the steps of:

- a. providing a sperm cell sample;
- b. adding a first media;

- c. staining the sperm cell sample in the first media;
- d. sorting the sperm cell sample to form one or more subpopulations of sperm cells;
- e. collecting the subpopulation of sperm cells in a second media;
- f. freezing the subpopulation of sperm cells in a third media;
- g. thawing the subpopulation of sperm cells; and
- h. mixing the thawed subpopulation of sperm cells with one or more eggs to fertilize one or more of the eggs;

wherein at least one of the first media, the second media or the third media contains at least one OSR having a concentration in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml, and wherein the OSR containing media may be prepared before addition to the sperm cell sample or by addition of an OSR stock solution to the sperm cell sample solution.

93. The method as claimed in claim 91 or 92, wherein the OSR is selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers), tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.

94. The method as claimed in claim 93, wherein the OSR is selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocoperyl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.

95. The method of claim 93, wherein the concentration of the added OSR is in the range of 0.05 to 0.5 mg/ml in the sperm cell composition.

96. The method of claim 93, wherein the concentration of the added OSR is selected from the group of: about 0.05 mg/ml; about 0.1 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.45 mg/ml; and about 0.5 mg/ml.

97. The method of any one of claims 91-96, wherein the sperm cell sample is unfrozen.

98. The method of any one of claims 91-96, wherein the sperm cell sample is frozen.

99. The method of any one of claims 91-98, wherein the sperm cell sample is derived from a human, bovine, swine, ovine, equine, deer, elk, buffalo, canine, feline, chimpanzee, gorilla, whale, dolphin and other marine mammals.

100. The method of any one of claims 71-80 or 91-99, wherein the eggs were cultured in maturation media.

101. The method of claim 100, wherein the maturation media comprises FBS, pyruvate, chorionic gonadotropin, FSH, estradiol and at least one antibiotic.

102. The method of claim 101, wherein the maturation media also comprises TCM-199.

103. The method of claim 102, wherein the egg was cultured in maturation media comprising TCM-199, FBS, pyruvate, chorionic gonadotropin, FSH, estradiol and at least one antibiotic in the approximate ratio of 9:1:0.02:0.1:0.01:0.01:0.02 by volume, respectively.

104. A sorted embryo produced by the method comprising:

- a. providing a sperm cell sample;
- b. adding a first media;
- c. staining the sperm cell sample in the first media;
- d. sorting the sperm cell sample to form one or more subpopulations of sperm cells;
- e. collecting the subpopulation of sperm cells in a second media; and
- f. mixing the subpopulation of sperm cells with one or more eggs to produce one or more embryos;

wherein the first media and/or the second media contains at least one OSR in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml, and wherein the OSR containing media may be prepared before addition to the sperm cell sample or by addition of an OSR stock solution to the sperm cell sample solution.

105. A sorted embryo produced by the method comprising the steps of:

- a. providing a sperm cell sample;
- b. adding a first media;
- c. staining the sperm cell sample with a first media;
- d. sorting the sperm cell sample to form at least one subpopulation of sperm cells;
- e. collecting the subpopulation of sperm cells in a second media;
- f. freezing the subpopulation in a third media;
- g. thawing the subpopulation; and
- h. mixing the subpopulation of sperm cells with one or more eggs to produce one or more embryos,

wherein at least one of the first media, the second media or the third media contains at least one OSR having a concentration in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml, and wherein the OSR

containing media may be prepared before addition to the sperm cell sample or by addition of an OSR stock solution to the sperm cell sample solution.

106. The embryo as claimed in claim 104 or 105, wherein the OSR is selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers), tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.

107. The embryo as claimed in claim 106, wherein the OSR is selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.

108. The embryo of claim 106, wherein the concentration of the added OSR is in the range of 0.05 to 0.5 mg/ml in the sperm cell sample.

109. The embryo of claim 106, wherein the concentration of the added OSR is selected from the group of: about 0.05 mg/ml; about 0.1 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.45 mg/ml; and about 0.5 mg/ml.

110. The embryo of any one of claims 104-109, wherein the sperm cell sample is unfrozen.

111. The embryo of any one of claims 104-109, wherein the sperm cell sample is frozen.

112. The embryo of any one of claims 104-111, wherein the sperm cell sample is derived from a human, bovine, swine, ovine, equine, deer, elk, buffalo, canine, feline, chimpanzee, gorilla, whale, dolphin and other marine mammals.

113. The embryo of any one of claims 104-112, wherein the egg was cultured in maturation media.

114. The embryo of claim 113, wherein the maturation media comprises FBS, pyruvate, chorionic gonadotropin, FSH, estradiol and at least one antibiotic.

115. The embryo of claim 114, wherein the maturation media further comprises TCM-199.

116. The embryo of any claim 115, wherein the egg was cultured in maturation media comprising TCM-199, FBS, pyruvate, chorionic gonadotropin, FSH, estradiol and at least one antibiotic in the approximate ratio of 9:1:0.02:0.1:0.01:0.01:0.02 by volume, respectively.

117. A sperm cell composition comprising:
- a. a sperm cell sample; and
 - b. at least one OSR having a concentration in the range of 0.01 mg/ml to 5 mg/ml.
118. The sperm cell composition of claim 117, wherein the sperm cell sample has been sorted.
119. The sperm cell composition of claim 117 or 118, further comprising a stain.
120. The sperm cell composition of any one of claims 117-119, further comprising an extender or media.
121. The sperm cell composition of any one of claims 117-120, further comprising a cryoprotectant.
122. The sperm cell composition of any one of claims 117-121, wherein the OSR is selected from the group comprising: catalase, SOD, an SOD mimic, glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, pyruvate, mercaptoethanol, BHT, lipoic acid, flavins, quinines, vitamin K (and related vitamers), vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E (and related vitamers), tocopherols, tocotrienols, α -tocopheryl, alpha ketoglutarate (AKG), malondialdehyde (MDA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and biologically active derivatives thereof.
123. The sperm cell composition of claim 122, wherein the OSR is selected from the group comprising: vitamin B12, vitamin B12 vitamers, vitamin E, vitamin E vitamers, tocopherols, tocotrienols, α -tocoperyl, alpha ketoglutarate, and derivatives thereof.
124. The sperm cell composition of any one of claims 122-123, wherein the concentration of the added OSR is in the range of 0.05 to 0.5 mg/ml in the sperm cell sample.
125. The sperm cell composition of claim 124, wherein the concentration of the added OSR is selected from the group of: about 0.05 mg/ml; about 0.1 mg/ml; about 0.15 mg/ml; about 0.25 mg/ml; about 0.35 mg/ml; about 0.45 mg/ml; and about 0.5 mg/ml.
126. The sperm cell composition of any one of claims 117-125, wherein the sperm cell sample is unfrozen.
127. The sperm cell composition of any one of claims 117-125, wherein the sperm cell sample is frozen.
128. The sperm cell composition of any one of claims 117-127, wherein the sperm cell sample is derived from a human, bovine, swine, ovine, equine, deer, elk, buffalo, canine, feline, chimpanzee, gorilla, whale, dolphin and other marine mammals.

129. A maturation media for ART, comprising FBS, pyruvate, chorionic gonadotropin, FSH, estradiol and at least one antibiotic.
130. The maturation media of claim 129, further comprising TCM-199.
131. The maturation media of claim 130, comprising TCM-199, FSH, chorionic gonadotropin, estradiol, pyruvate and at least one antibiotic in the approximate ratio of 9:1:0.02:0.1:0.01:0.01:0.02 by volume, respectively.
132. The processed sperm sample as claimed in any one of claims 63-70 that is frozen.
133. The embryo as claimed in any one of claims 81-90 or 104-116 that is frozen or vitrified.
134. The sperm cell composition as claimed in any one of claims 117-128 that is frozen.
135. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein the sperm cell sample has been frozen and thawed prior to further processing, put through a multistep sorting procedure, and used directly in ART without freezing.
136. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein the sperm cell sample has been frozen and thawed prior to further processing, put through a multistep sorting procedure, and frozen.
137. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein the sperm cell sample is unfrozen, put through a multistep sorting procedure, and used directly in ART without freezing.
138. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein the sperm cell sample is unfrozen, put through a multistep sorting procedure, and frozen.
139. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein one or more OSRs are added in the staining step.
140. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein one or more OSRs are added in the collection step following sorting.
141. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein one or more OSRs are added in the cryogenic preparation step prior to freezing.
142. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein one or more OSRs are added in the staining step and collection step.
143. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein one or more OSRs are added in the collection step and cryogenic preparation step prior to freezing.

144. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein one or more OSRs are added in the staining step, the collection step and the cryogenic preparation step prior to freezing.

145. The method as claimed in any one of claims 139-144, wherein at least one OSR is a vitamer of vitamin B12 and added at the concentration of 0.25 mg/ml in the sperm cell suspension.

146. The method as claimed in any one of claims 139-144, wherein at least one OSR is a vitamer of vitamin B12 and added at a concentration in the range of 0.15 mg/ml to 0.5 mg/ml in the sperm cell suspension.

147. The method as claimed in any one of claims 139-144, wherein at least one OSR is a vitamer of vitamin E and added at a concentration in the range of 0.15 mg/ml to 0.5 mg/ml in the sperm cell suspension.

148. The method as claimed in any one of claims 139-144, wherein at least one OSR is an active form of AKG and added at a concentration in the range of 0.15 mg/ml to 0.5 mg/ml in the sperm cell suspension.

149. The method as claimed in any one of claims 139-144, wherein two OSRs are used in combination selected from the group comprising: a vitamer of vitamin B12 added at a concentration in the range of 0.15 mg/ml to 0.5 mg/ml, a vitamer of vitamin E added at a concentration in the range of 0.15 mg/ml to 0.5 mg/ml, and an active derivative of AKG at a concentration in the range of 0.15 mg/ml to 0.5 mg/ml in the sperm cell suspension.

150. The method as claimed in any one of claims 1-16, 31-62, 71-80, or 91-103, wherein the sperm cell sample contains unwanted dead cells.

151. The method as claimed in claim 150, wherein the sperm cell sample is manually ablated to kill unwanted cell types within the sperm cell sample.

ABSTRACT

The present invention relates to compositions and methods for the handling of processed sperm including samples that are freshly collected, those transported as fresh samples, samples that are frozen and thawed, those sorted into one or more subpopulations, and those that are otherwise processed or handled that impose trauma on the cell. Trauma can reduce the motility, fertility, viability and overall integrity of the sperm and reduce the ability to fertilize, produce an embryo and a healthy offspring. The present invention relates to novel compounds that can be added to the sperm cell sample to reduce the traumatic effects of physical stress during mild as well as extensive sperm cell processing, methods of using the compounds in standard sperm processing procedures, the end products made from these methods including sperm and embryos, as well as methods of using those end products in assisted reproductive biology techniques in animals.

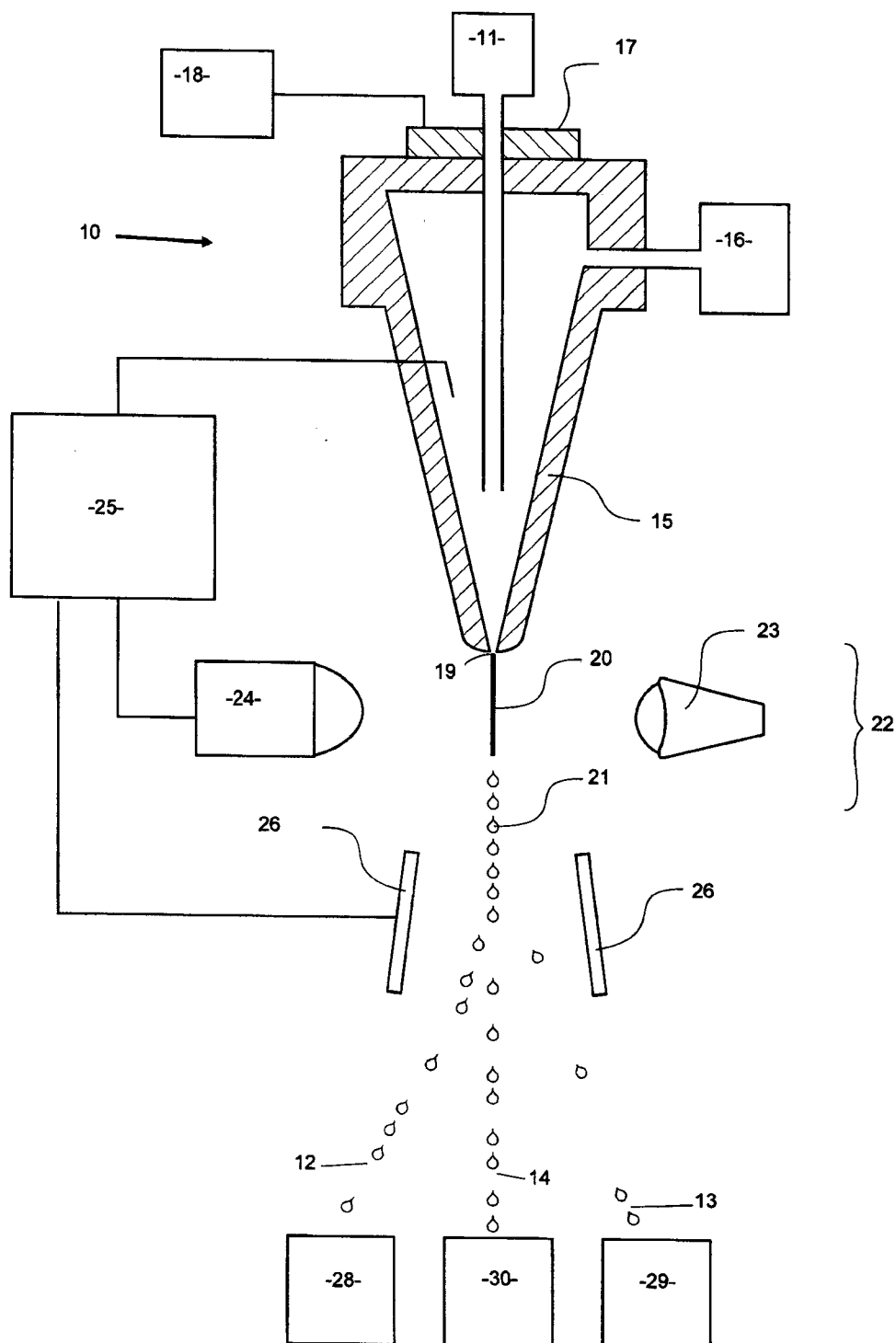


FIG. 1

Figure 2

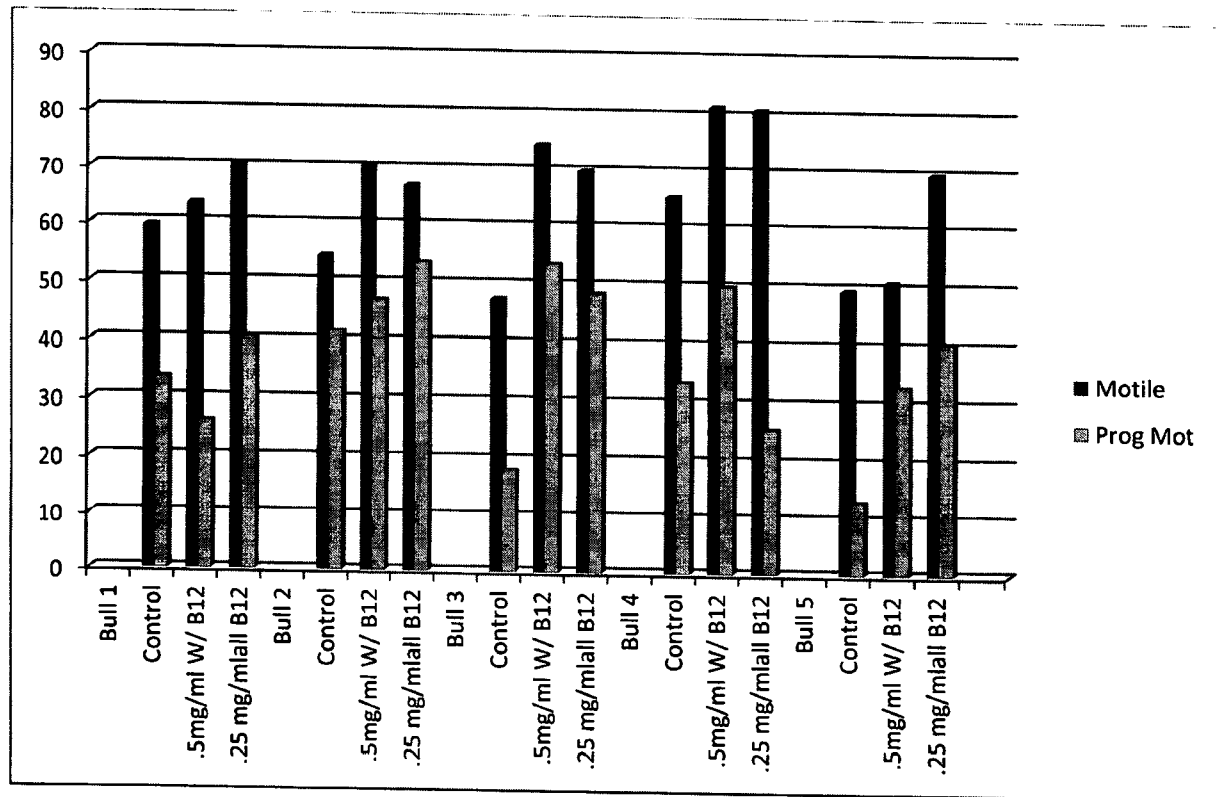
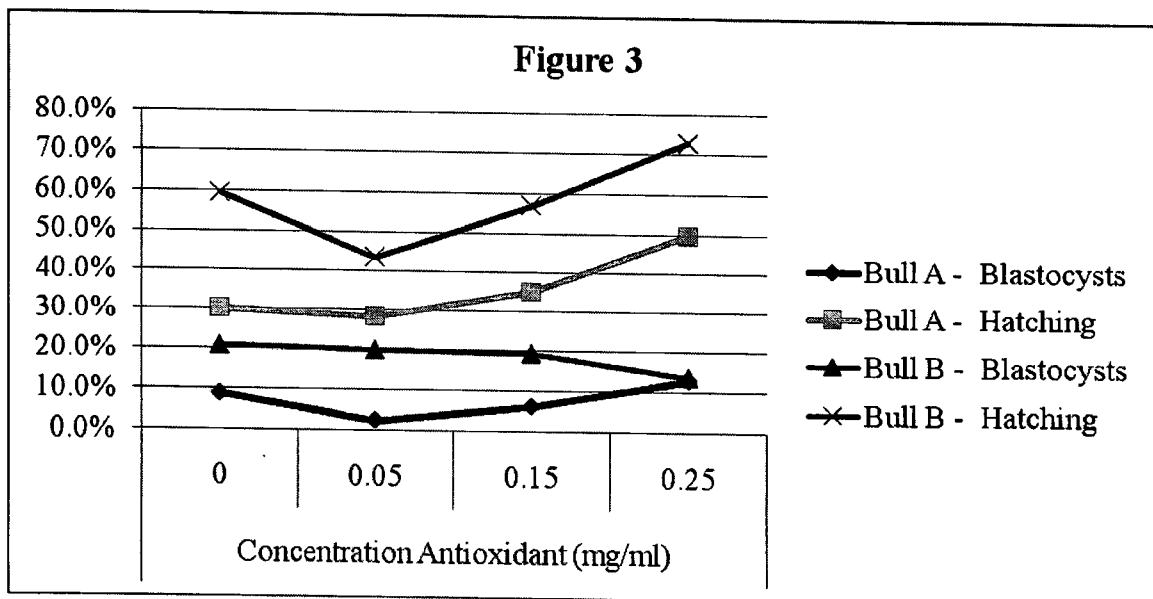
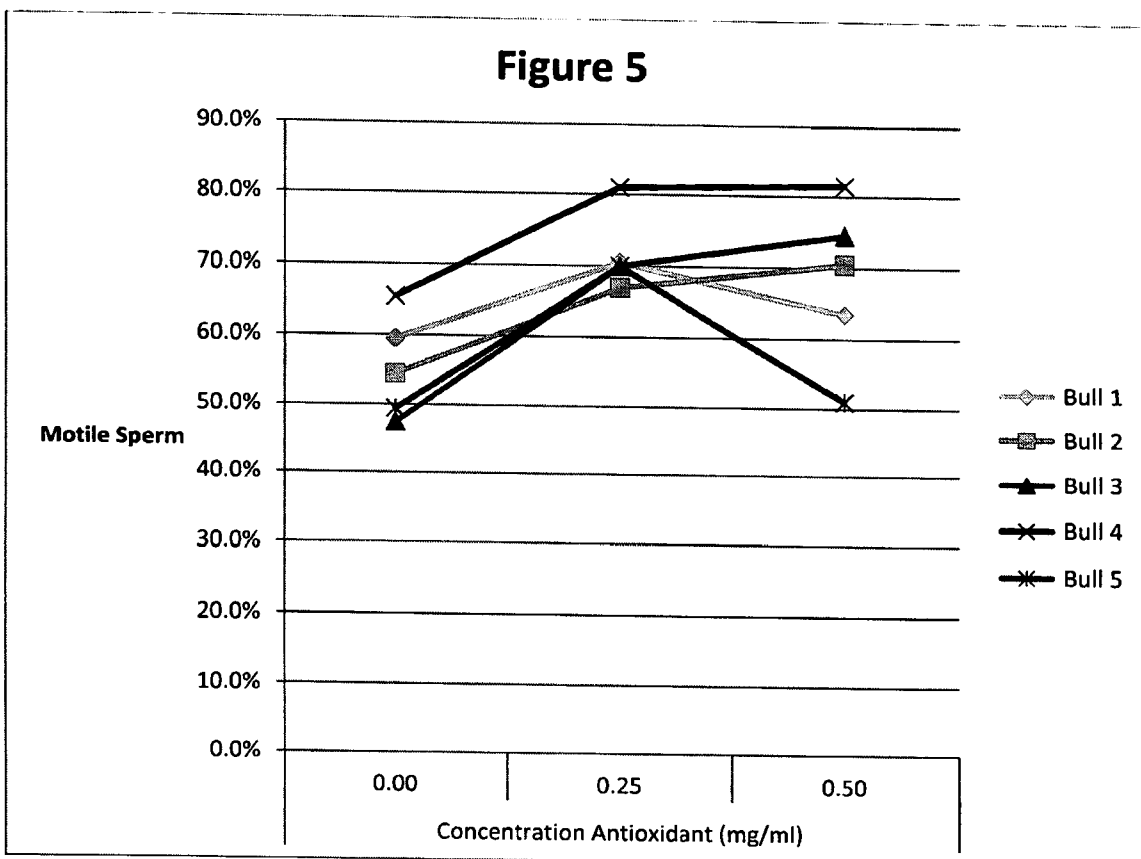
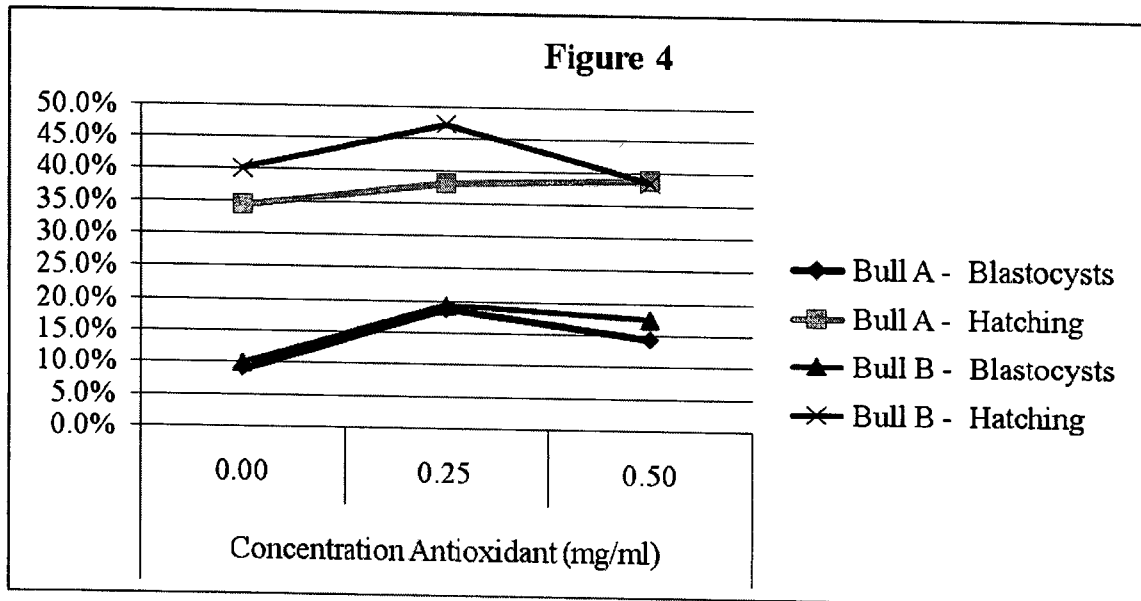
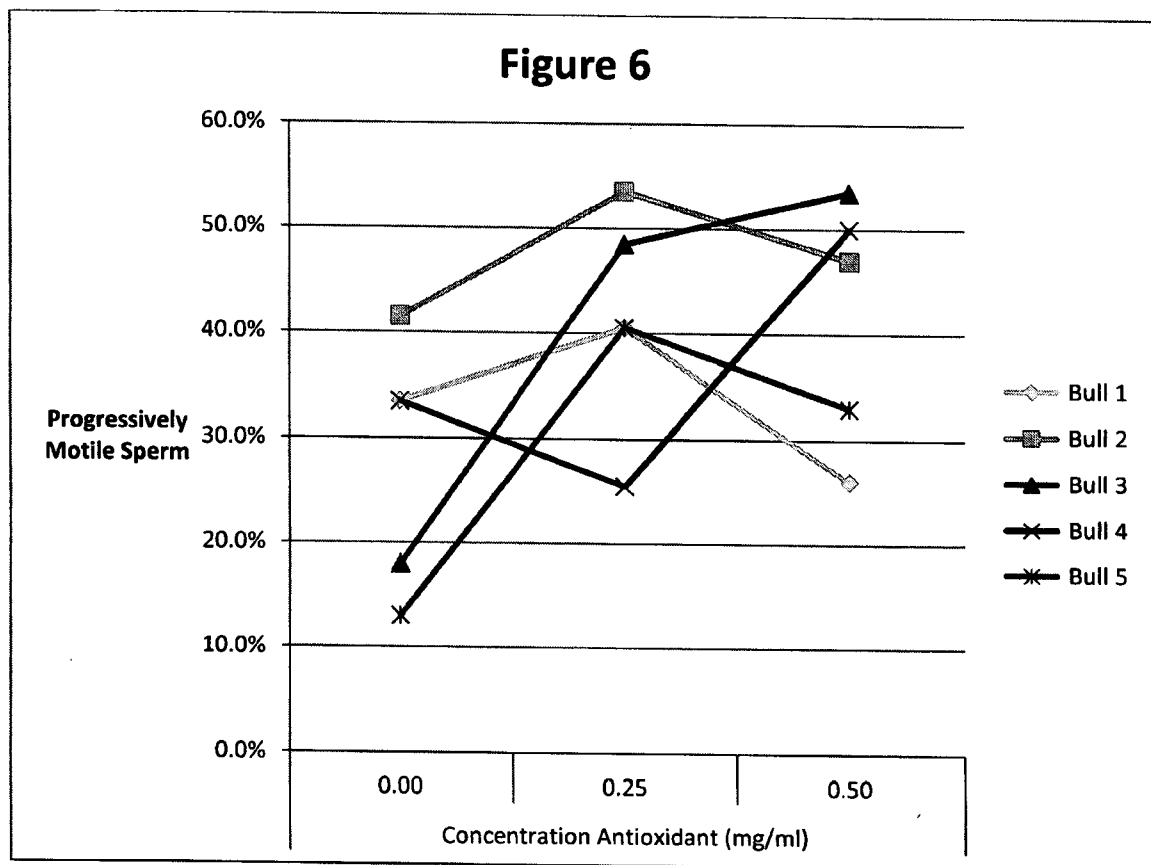


Figure 3







**PODER PARA TRASPASO &
REPRESENTACION**

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales, nombres de dominio, derechos de autor y registros sanitarios.

Nosotros, firmantes (Nombre(s) completo):

Richard W. Lenz
Juan F. Moreno
Ramakrishnan Vishwanath

Aquí llamados CEDENTE(s) y propietario(s), declara(n) por este documento que cede(n) la (Identifique plenamente la propiedad a ceder - marca, patente u otro-):

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR LA CALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES PROCESADOS

A

La empresa (Nombre de la empresa):

INGURAN, LLC

Una empresa constituida bajo las leyes de (Indique el país/jurisdicción):

Navasota, Texas USA

Domiciliada en (Domicilio de la empresa):

22575 State Highway 6 South, Navasota, Texas

Representada por (Nombre del representante):

Maurice Rosenstein, Co-CEO Inguran, LLC

(aquí llamado el CESIONARIO)

**POWER OF ATTORNEY FOR ASSIGNMENT
& REPRESENTATION**

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans, domain names, copyrights and health registrations.

We, the undersigned (Complete name(s)):

Richard W. Lenz
Juan F. Moreno
Ramakrishnan Vishwanath

Hereinafter the ASSIGNOR(s) and owner(s) declares by this document that assigns the (Enter and identify in detail the property to assign -trademark, patent or other-):

COMPOSITIONS AND METHODS FOR IMPROVING THE QUALITY OF PROCESSED SPERM

To

The corporation (Name of the corporation):

INGURAN, LLC

A corporation organized under the laws of (Enter the country/jurisdiction):
Navasota, Texas USA

Domiciled in (Domicile of the corporation):

22575 State Highway 6 South, Navasota, Texas

Represented by (Name of representative):

Maurice Rosenstein, Co-CEO Inguran, LLC

(which in this document will be called the ASSIGNEE)

Por el presente acto, el CESIONARIO acepta dicho traspaso y nombra a ALVARO RAMÍREZ BONILLA TP. 118.770., c.c. 79.790.039; María Mercedes DÍAZ SUÁREZ TP. 227.323 c.c. 1.020.751.662; ELIANA MARÍA REYES FERNÁNDEZ T.P. 203200., c.c. 1.032.417.130, domiciliados en la Carrera 13 No 29 - 21 Oficina 241, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1 o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal, el segundo y la tercera como suplente como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el suplente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o del suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otro según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad intelectual, propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección

The ASSIGNEE accepts the said assignment and do hereby appoint ALVARO RAMIREZ BONILLA, TP. 118.770, C.C.79.790.039; María Mercedes DÍAZ SUÁREZ TP. 227.323 c.c. 1.020.751.662; ELIANA MARÍA REYES FERNÁNDEZ T.P. 203200., c.c. 1.032.417.130, with domicile on Carrera 13 No 29 - 21 Oficina 241, Bogota, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal, the second and third as alternate, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. If any of the appointees were to be definitely absent, the alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal or the alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the alternates in their turn shall end at such time.

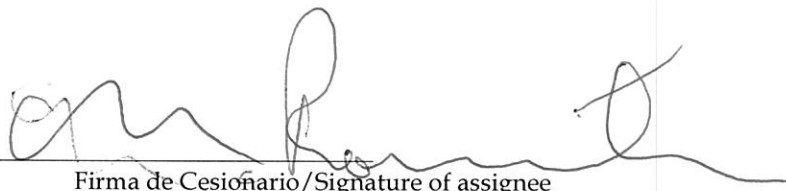
In addition, we grant a Power of Attorney in favour of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) intellectual property, industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorise the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court

del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. c) Obtención de un número de identificación tributaria y el registro ante la cámara de comercio competente; d) Solicitud de inscripción de obras y demás actos relacionados con derechos de autor ante la Dirección Nacional de Derechos de Autor o la entidad competente. e) Obtención y demás actos relacionados con registros sanitarios ante la autoridad nacional competente. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, solicitar la revocatoria y ratificar los actos de agentes oficiosos.

cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). c) Obtainment of a tax identification number and the register before the competent chamber of commerce; d) Registration and other related acts of copyrights before the competent authority. e) Obtainment and other related acts of health registrations before the competent authority. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, ask for revocation and ratify acts done by representatives without a power of attorney.



Firma de Cedente/Signature of Assigner



Firma de Cesionario/Signature of assignee

Dec 13, 2013 Marafuta TX USA

Nov 22nd 2013 Marafuta TX USA

Firmado en la fecha y lugar/Signed on the date and place

RESUMEN

La invención se refiere de forma general a composiciones y métodos para el manejo de poblaciones de esperma procesado que incluyen muestras recién extraídas, las que se transportan como muestras recién extraídas, así como las muestras que se congelan y
5 descongelan, las que se clasifican en una o más subpoblaciones y las que de otro modo se procesan o manejan de forma tal que ejercen un trauma sobre la célula espermática. Dicho trauma puede reducir la movilidad, fecundidad, viabilidad e integridad global del esperma y reducir la capacidad del esperma de fecundar un huevo, crecer como un embrión saludable y producir una cría sana. La presente invención se refiere a compuestos nuevos que pueden
10 agregarse a la muestra de célula espermática para reducir los efectos traumáticos de la tensión física durante el procesamiento de células espermáticas moderado así como exhaustivo, métodos para utilizar los compuestos en procedimientos de procesamiento de esperma estándar, los productos finales preparados a partir de estos métodos que incluyen esperma y embriones así como los métodos para utilizar dichos productos finales en
15 técnicas biológicas de reproducción asistida en animales.