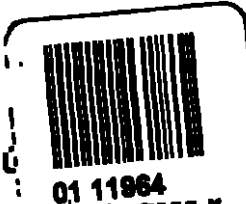


PETITORIO



FORMULARIO



SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
 Modificación 01/01/96 6.3.2004
 Fecha Validez: 02/02/10 10133150
 Transm. 1 2.2 FIRMADO D 1 REGISTRAR 411 FASES/ETAPAS
 D D Dependencias: Es la División de Normas Técnicas

SOLICITUD DE REGISTRO DE

1 ☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

2 SOLICITANTE

Nombre: **OVO BIOSCIENCES INC.**
 Dirección: **1180 E Broad Street**
 Teléfono: Fax:
 E-mail:
 Domicilio: **Athens GEORGIA 30602-5412**
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

IDENTIFICACIÓN
 CC ☐ NIT ☐
 CE ☐ Otro ☐
 Número:

3 REPRESENTANTE O APODERADO 74

Nombre: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.**
 Dirección: **CARRERA 9 No 93-09**
 Teléfono: **610 74 80** Fax:
 E-mail: **acastell@impsat.net.co**

IDENTIFICACIÓN
 CC ☒ NIT ☐
 CE ☐ Otro ☐
 Número: **39'779 654** TP: **70819**

4 INVENTOR (ES) 72

Nombre: **(VER ANEXO No 1)**
 Dirección:
 Teléfono: Fax:
 E-mail:
 Domicilio:

IDENTIFICACIÓN
 CC ☐ NIT ☐
 CE ☐ Otro ☐
 Número:

5 TÍTULO (54)

ACTIVACIÓN, INOVO, DE UN HUEVO DE AVE EN SU CÁSCARA

6 Clasificación Internacional (51)

A161D 19702

7 Prioridad
 SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

15/02/00

16/02/00

(31) Número de Solicitud

60/182432

60/182969

8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los
 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☒ Otro ☐

9 Comprobante de pago No

9456 9456 9457

Fecha

FEB 15 / 2001

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario ver reverso de esta página

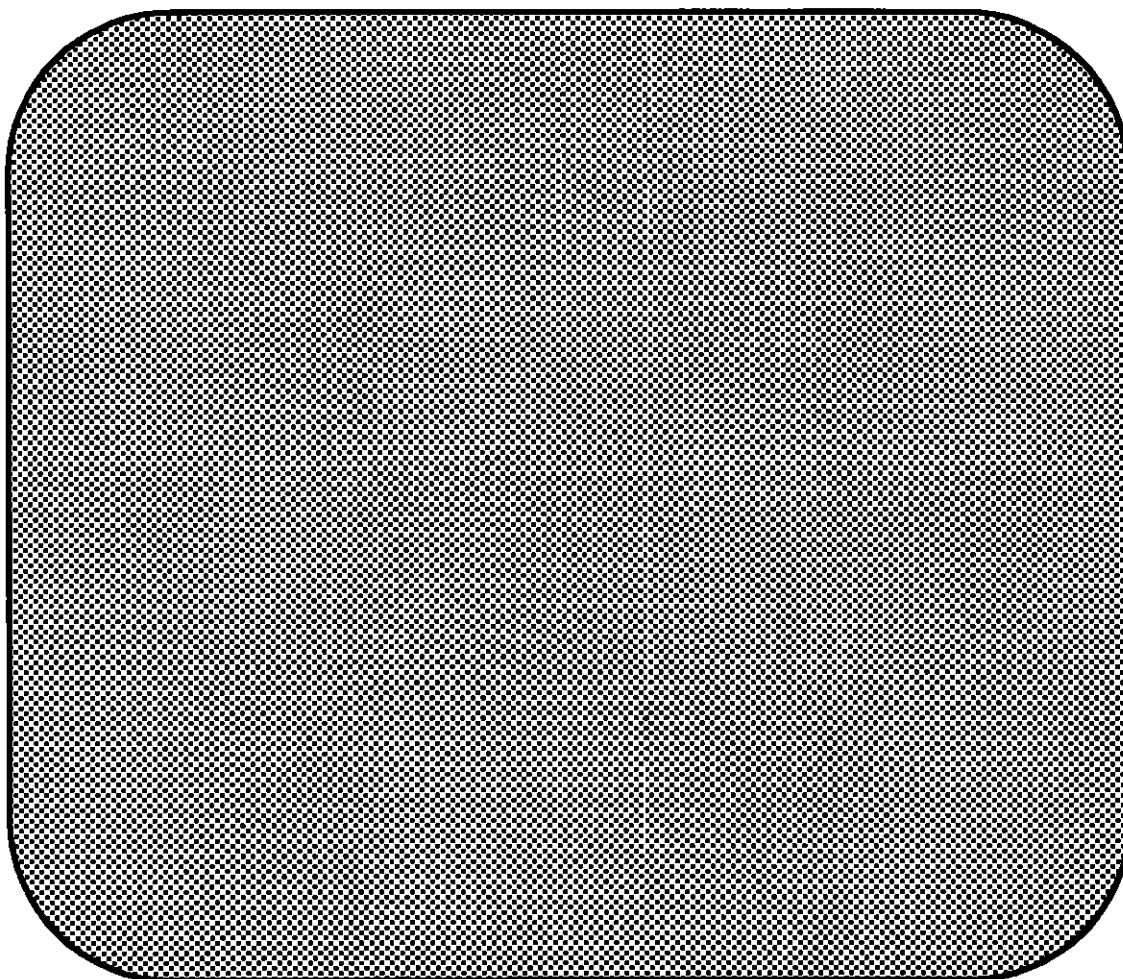
2

10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Artes finales 12 x 12 cm, 2 ejemplares

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

15 FEB 2001

FIRMA

Margarita Castellanos

C CH392779 664 USCH LT-P 170519 del Cons. Sub. Jud.

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

ANEXO No. 1

LISTA DE INVENTORES

NOMBRE

DIRECCION

- | | |
|----------------------|---|
| 1. WOOTEN, Andrew | 1031 Scott Terrace,
Athens, Georgia 30606
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA |
| 2. CANTRELL, Timothy | 3403 Maynard Circle,
Gainesville, Georgia 30506
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA |

MEMORIA DESCRIPTIVA
DE LA
PATENTE DE INVENCION

SOBRE

**" ACTIVACIÓN "IN OVO" DE UN HUEVO DE
AVE EN SU CASCARA "**

PRIORIDAD AMERICANA No. 60/182432 DE: 15/02/2000

PRIORIDAD AMERICANA No. 60/182969 DE: 16/02/2000

SOLICITADA POR : OVO BIOSCIENSES, INC.

**DOMICILIO : 1180 E. Broad Street, Athens, Georgia
30602-5412, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA.**

**APODERADA: DRA.: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
BOGOTÁ - COLOMBIA**

ACTIVACION 'IN OVO' DE UN HUEVO DE AVE EN SU CÁSCARA

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

ÁREA DE LA INVENCIÓN

La presente invención abarca el área de la activación de huevo de ave y en particular esta invención se refiere a métodos de activación de huevos en su cáscara. La invención además incluye un método de activación de huevos dentro de la cáscara, a efectos de empollar un polluelo vivo.

ANTECEDENTES

CRÍA TRADICIONAL

Habitualmente la cría en la industria avícola se efectúa de acuerdo a uno de dos sistemas:

Programa de cría en suelo. El primer sistema se denomina „cría en suelo“ y se aplica para producir la gran mayoría de los huevos empollados para su comercio. En este sistema los machos simplemente son agregados a los lotes de las hembras en una relación habitual de aproximadamente 10 a 15%. El sistema de cría de suelo, a pesar de sus deficiencias representa actualmente el sistema de menor costo para producir huevos empollados, dado que requiere menos esfuerzo que los demás sistemas. El índice promedio de empollado varía entre aproximadamente 83% en cría de pollos a 92% en cría de ponedoras. Aunque este sistema por muchos años constituyó la base de la industria avícola, presenta múltiples limitaciones.

Tamaño versus capacidad de reproducción. Ya no se emplea la cría de suelo en el caso de pavos, dada la intensiva selección debido al mayor desarrollo muscular que ha derivado en pavos de cría comercial incapaces de aparearse naturalmente. Una tendencia similar se observa en pollos. La selección por aumentar el tamaño de los pollos ha comprometido la fertilidad y la capacidad de

apareamiento y se presume que la fertilidad continuará disminuyendo mientras aumenta el peso del ave. Esto representa una disyuntiva para los productores de pollos, dado que la disminución de fertilidad provoca un directo impacto negativo en su nivel mínimo.

Inaeficiente remoción de desechos. La procreación natural debe llevarse a cabo sobre pisos sólidos a fin de evitar lesiones a las aves. Esta exigencia del diseño impide el uso de sistemas automáticos de remoción de desechos y requiere una limpieza manual entre lotes sucesivos de aves. Esto incrementa las tareas y los mayores costos, mientras disminuye el uso productivo de las instalaciones.

Producción y calidad de los huevos. Debido a que los huevos permanecen en los criaderos con el lote de aves hasta su recolección, los huevos frecuentemente son contaminados con suciedad y materia fecal, lo que puede reducir el índice de reproducción. Además, habitualmente entre 3% y 5% de los huevos producidos en criaderos de suelo, directamente son puestos en el suelo en lugar de los nidos provistos y deben descartarse.

Uso ineficiente del espacio y del equipamiento. La mantención conjunta de machos y hembras en un criadero de suelo requiere la instalación de dos sistemas independientes de bebederos y comederos, debido a las diferentes exigencias de nutrición y producción de cada sexo. Además exige la instalación de nidos y de sistemas automáticos de recolección de huevos. Todo este equipo ocupa una parte del suelo del criadero. A causa de ello, la cría de suelo no representa un aprovechamiento eficiente del espacio y del equipamiento comparándola con los sistemas de jaulas superpuestas.

Mortalidad y fertilidad. Machos agresivos tienden a pelear, desembocando en mayores tasas de mortalidad de machos. El promedio de mortalidad de machos en criaderos de suelo es del 13% vs. un 2% en criaderos de jaulas. La agresión

masculina contra las gallinas durante el apareamiento gradualmente produce una mayor mortalidad de hembras, una fertilidad disminuida y un ciclo más corto de producción de huevos. En cuanto los machos de un lote envejecen, la fertilidad comienza a declinar. La solución estándar es introducir algunos machos jóvenes en el lote para mejorar la fertilidad. Sin embargo, esto produce otra ronda de agresiones con un corto plazo de menor fertilidad y un aumento de mortalidad. Las enfermedades se producen con mayor frecuencia en criaderos de suelo a causa del constante contacto de las aves con las camas y los desechos que albergan organismos patógenos.

Menor conversión de alimento. El control del costo de la alimentación resulta crítico al llevar adelante un emprendimiento avícola competitivo. Así, el costo del alimento puede ascender hasta el 60% del costo de crianza de un pollo. Según un estudio, las aves criadas en suelo consumían un 20% más de alimento para idéntica producción que aquellas criadas en jaulas. Esa diferencia se debe al mayor nivel de interacción social, así como de actividad física observada en criaderos de suelo. Los machos consumen más alimento que las hembras haciendo ineficiente el sistema de crianza en suelo respecto del consumo de alimento, debido a la gran cantidad de machos que deben mantenerse.

Limitada flexibilidad en estrategias de crianza. Debido al hecho de que machos y hembras están alojados en un gran grupo en los criaderos de suelo, el criador se halla muy limitado en su posibilidad de lograr cruza y selecciones de avanzada dentro del lote de cría. Por esta razón los criaderos de suelo se utilizan básicamente para la multiplicación de lotes genéticos preseleccionados a fin de producir finalmente cruza comerciales.

Programa de crianza con inseminación artificial. Otro sistema utilizado para la generación de huevos para empollar es la inseminación artificial (IA). La IA está ampliamente difundida entre los "criadores primarios" de la cúspide de la pirámide

de criadores pero generalmente no aplicada por los productores de la base de esa pirámide. Los criadores primarios son compañías que poseen y mejoran las líneas genéticas de pedigrís de elite que se cruzan para obtener el producto final comercializado —pollos, ponedoras y pavos—. La cantidad de aves aumenta de forma exponencial al descender la pirámide de cría desde las líneas de pedigrís hasta los lotes de la tercera generación, los lotes de padres y finalmente hasta las aves actualmente comercializadas. Mientras que las aves de la elite genética en la cúspide de la pirámide son de alto costo, las aves de la base son económicas. Por estas razones se utilizan diferentes modelos operativos para la reproducción a diferentes niveles.

En el sistema IA los machos y las hembras son alojados en el mismo sitio, pero se enjaulan por separado. En las jaulas para hembras habitualmente se alojan entre dos a cinco gallinas, mientras que las jaulas para machos contienen un solo gallo. Los programas de IA encauzan varias de las limitaciones antes indicadas de los criaderos de suelo. Por ejemplo, a partir del empleo de jaulas, puede efectuarse en forma automática la remoción de desechos. Los criaderos, generalmente, son mucho más limpios, lo que implica menor cantidad de enfermedades. Se aumenta la producción de huevos, dado que los huevos se deslizan fuera de las jaulas y no son puestos sobre el piso sucio. Se utiliza de modo más eficiente el equipamiento y el espacio del criadero. La mortalidad es minimizada debido a la disminución de la agresión social y de las enfermedades. Los niveles de fertilidad se mantienen más constantes, dado que la interacción social y física se eliminan del proceso de reproducción. La conversión alimentaria se incrementa y finalmente, aumenta la flexibilidad del sistema productivo a causa de las cruces y selecciones de avanzada. Los criadores primarios requieren absolutamente esta capacidad a fin de mejorar sus stocks genéticos y poder competir en el mercado. Mientras que la mayoría de las ventajas antes enunciadas también son importantes para criadores

de reproductores a nivel comercial, quedan descartados a causa de una deficiencia crucial, los elevados costos de mano de obra de los programas de IA. Los programas de IA reemplazan la innata actividad sexual de las aves por mano de obra. Los operarios deben recolectar manualmente semen de los machos enjaulados e inseminar a las hembras en las jaulas con una rotación de 7 días. El nivel de sofisticación requerido por estos programas demanda operadores especializados. Por ello, el programa de IA, aunque operativamente superior, no puede ponerse en práctica en programas de cría a nivel comercial. Incluso empleando gallinas pigmeas, una innovación que permite una producción similar de huevos con un consumo alimenticio aproximadamente 30% menor, no puede compensar los mayores costos de mano de obra del programa de IA para criadores reproductores a nivel comercial.

PROCESO REPRODUCTIVO

En el momento de la ovulación, el oocito de ave comprende un disco blastodérmico o germinal que contiene el pronúcleo femenino y la masa amarilla del vitelo. El disco germinal y la masa del vitelo están recubiertos por la membrana celular del oocito, denominada oolemma. Alrededor del oolemma se encuentra la capa perivitelina (CP), también denominada capa perivitellina interna (CPI). El espacio entre el oolemma y la CPI es llamado el espacio perivitelino que es atravesado por células granulosa. Posteriormente al desprendimiento del oocito del folículo ovárico, adquiere la denominación de óvulo. El óvulo se moviliza hacia dentro del oviducto, siendo atrapado por el infundíbulo, en donde se efectúa la fertilización, en el caso de presencia de espermia.

Al pasar el óvulo al infundíbulo posterior, otra capa, la capa perivitellina externa (CPE) envuelve el óvulo. Esta membrana cumple la función de prevenir la polispermia, condición letal que se produce en presencia de múltiples espermatozoides que penetran en el óvulo en el sector del disco blastodérmico.

Posteriormente el huevo es encubierto por capas adicionales de calaza y capas finas y gruesas de albúmina. Al introducirse el óvulo dentro del istmo, se encuentran allí dos membranas de cáscara, sobre las que se depositan pequeños cristales de carbonato de calcio, a efectos de iniciar la formación de la cáscara.

Los sucesos enunciados se suceden todos en algunas pocas horas después de la fertilización. Posteriormente el óvulo se introduce en el útero, en donde se completa la cáscara de calcio en las próximas 18-20 horas. Después el huevo permanece por algunos minutos en la vagina para ser expelido de la misma o realizado el acto de poner un huevo. En este punto, si el huevo fue fertilizado, el embrión contenido en el mismo presentará 40.000 a 70.000 células (Johnston, "In Vitro Sperm Binding, Penetration and Fertilization of Recently Oviposited Chicken Eggs," diciembre 1988, Universidad de Clemson); Olsen, M.W., J. Morph. 70: 413-533 (1942); Etches et. al., en "Methods in Molecular Biology, vol. 62 *Recombinant Gene Expression Protocols*, Ed. R. Tuan, Humana Press, Inc. Totowa, NJ, págs. 433-450 (1997); Petitte et.al., en *Manipulation of the Avian Genome*, Ed. Etches et. al., CRC Press, Boca Raton, FL, págs. 81-101 (1993)).

En caso de que el huevo puesto no fue fertilizado, ya previamente no presenta la posibilidad de formar un polluelo vivo (múltiples citas).

TRANSGENESIS

Durante largo tiempo ha constituido un desafío para los genetistas avícolas lograr suplementar los procedimientos de selección tradicional insertando genes deseables directamente en la línea germinal de las aves. Se han logrado progresos substanciales en dichas líneas germinales en algunas especies de mamíferos, en donde resultan accesibles los embriones pequeños y en donde los pronúcleos pueden visualizarse a efectos de la inserción de ADN exógeno. La producción de ratones, vacunos, ovejas y cabras transgénicas se tornó un proceso de rutina en vastas operaciones comerciales. Contrariamente, en las

aves no puede accederse fácilmente al embrión pequeño, presentándose los pronúcleos oscurecidos a simple vista, convirtiendo la manipulación *in ovo* del genoma en embriones pequeños de aves en un desafío prácticamente invencible. El desarrollo de aves genéticamente modificadas exige el acceso a células embrónicas pluripotentes con escaso desarrollo. Pero como la primer etapa del desarrollo embrional se lleva a cabo dentro del oviducto de la hembra, la introducción de ADN heterólogo en un pequeño embrión sólo sería posible extrayendo el embrión de la hembra, requiriendo ésta que sea sacrificada. Además, mientras que el cultivo del pequeño embrión a empollar es llevado a cabo, el método resulta extremadamente complejo y resulta en un índice de supervivencia de post-crianza de sólo 10% aprox. Sang et. al., en *Manipulation of the Avian Genome*, Ed. Etches et. al., CRC Press Boca Raton, FL, págs. 121-133 (1993).

La presente invención provee una notable mejora en la biología avícola haciendo posible la activación de un huevo puesto en su cáscara, hasta salir un polluelo vivo del cascarón, denominándose el método activación 'in ovo'. Estos métodos brindan una alternativa a la crianza en suelo y la fertilización IV, la que puede incrementar en gran medida la eficiencia de la producción avícola. Dichos métodos asimismo permiten un acceso a pequeños embriones de ave de modo tal que las especies avícolas transgénicas puedan desarrollarse con mayor rapidez.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee un método para producir un polluelo vivo a partir de un huevo de ave puesto no fertilizado en su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo recubierto por una membrana y un óvulo, incluyendo la activación del óvulo y la incubación del huevo hasta la salida del cascarón.

La presente invención provee un método para fertilizar un huevo de ave dentro de su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo recubierto por una membrana,

incluyendo la obtención de muestras de esperma, específicamente, esperma de ave en un vehículo fisiológicamente aceptable, para administrar la muestra de esperma al interior del huevo, a fin de fertilizar el huevo, incubarlo hasta la salida del polluelo vivo del cascarón.

Asimismo, la presente invención presenta un huevo puesto de ave en un estado temprano de evolución.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo a lo aquí empleado "un", "unos" o "los" puede equivaler a uno o más huevos. Por ejemplo, "un" huevo puede significar uno solo o más de uno. Asimismo, "el" huevo puede ser un huevo o más de un huevo.

La presente invención provee un método para producir un polluelo vivo a partir de un huevo de ave puesto no fertilizado en su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo recubierto por una membrana, incluyendo la activación del óvulo y la incubación del huevo hasta la salida del cascarón. De aquí en más se usará "óvulo" u "oculto" indistintamente. La presente invención se refiere al inesperado y sorpresivo descubrimiento que un huevo de ave puesto no fertilizado puede activarse en su cáscara y producir un polluelo vivo.

Conforme lo aquí empleado, la remisión a un huevo de ave en su cáscara se refiere a un huevo puesto, es decir, un huevo con una cáscara de carbonato de calcio que fue expelido de la vagina del ave. Al expelido del huevo habitualmente se lo denomina "poner un huevo" u 'oviposition'. En concordancia cualquier referencia a "un huevo en su cáscara" o "un huevo puesto" se consideran equivalentes en su significado. El proceso de activación de un huevo puesto en su cáscara se denomina aquí "activación *in ovo*" (AIO). La activación a que se hace referencia equivale a la iniciación del desarrollo embrional en un huevo de puesto no fertilizado u ocultos, sea en ausencia o en presencia de células de esperma.

El huevo puede seleccionarse de cualquier especie de ave. Preferentemente el

ave es una gallina o pollo y en otro contexto preferencial el ave es un pavo.

El huevo puesto no fertilizado puede activarse por varios métodos como detallado posteriormente. Es de resaltar que varias de las técnicas utilizadas en la fertilización *in ovo* pueden aplicarse a otras formas de activación.

FERTILIZACION

La presente invención provee un método para fertilizar un huevo de ave dentro de su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo recubierto por una membrana, incluyendo la obtención de muestras de esperma, específicamente, esperma de ave en un vehículo fisiológicamente aceptable, para administrar la muestra de esperma al interior del huevo, a fin de fertilizar el huevo. La presente invención se refiere al inseparado y enriquecido de un huevo de ave puesto no fertilizado puede activarse en su cáscara y producir un polluelo vivo. Conforme lo aquí empleado, la remisión a un huevo de ave en su cáscara se refiere a un huevo puesto, es decir, un huevo con una cáscara de carbonato de calcio que fue expelido de la vagina del ave. Al expelido del huevo habitualmente se lo denomina "poner un huevo" u 'oviposition'. En concordancia cualquier referencia a "un huevo en su cáscara" o "un huevo puesto" se consideran equivalentes en su significado. El proceso de fertilización de un huevo puesto en su cáscara se denomina aquí "fertilización *in ovo*" (FIO).

Un huevo de ave comprende una cáscara dura, calcificada en el momento de la puesta del huevo. Dentro de la cáscara se encuentra la yema o vitelo que contiene nutrientes para apoyar el crecimiento y desarrollo de un embrión. Según lo aquí empleado un "embrión" equivale a un organismo en desarrollo que resulta del encuentro del pronúcleo femenino con el pronúcleo masculino durante el proceso de la fertilización del huevo. Mientras que un óvulo fertilizado (unicelular) puede denominarse un embrión, el mismo embrión unicelular también es llamado cigote.

Asimismo la fertilización in ovo puede practicarse en huevos puestos hace dos semanas, si los mismos se mantuvieron a temperatura ambiente, siendo ideal usar huevos recién puestos para obtener mejores resultados. En una realización preferida la muestra de espermatozoides es administrada al interior del huevo entre las 0 y 96 horas posteriores de ser puestos. Según una realización aún mejor la muestra de espermatozoides es administrada al interior del huevo entre las 0 y 72 horas de ser puestos, y aún mejor, la muestra de espermatozoides se administra entre las 0 y 48 horas de ser puestos. Mayormente se prefiere administrar la muestra de espermatozoides al interior del huevo entre las 0 y 24 horas de puestos, aunque es óptimo administrar la muestra de espermatozoides lo antes posible al interior del huevo. De cualquier modo, el momento ideal de la fertilización puede depender de las condiciones de mantención del huevo puesto, p. ej., de la temperatura, la humedad, etc. Por ejemplo, la fertilización puede mejorarse, si el huevo puesto no fertilizado se fertiliza antes de permitir su enfriamiento.

El espermatozoides para la muestra de espermatozoides puede obtenerse del ave aplicando los métodos conocidos por los especialistas, tales como el masaje abdominal que resulta bien conocido en el ambiente. Este método permite recolectar el espermatozoides (semen) eyaculado, el líquido seminal y el líquido transparente. El líquido transparente es un líquido similar al linfático que pasa desde los canales linfáticos a la superficie fállica durante la tumescencia fállica. El espermatozoides de ave también puede obtenerse en el mercado, según conocen los expertos del arte.

En una realización, el espermatozoides de la muestra de espermatozoides proviene de una sola ave. En otro caso el espermatozoides de la muestra es una mezcla de espermatozoides obtenido de más de un ave. Al utilizar una mezcla de espermatozoides de más de un ave en los métodos conforme la invención, puede incrementarse la probabilidad de una fertilización exitosa, porque si una de las aves, de la cual se obtuvo espermatozoides no es fértil, es posible que el espermatozoides recolectado del otro ave o de las otras aves

puedan fertilizar el huevo.

En una realización preferencial, la muestra de esperma comprende esperma de aves, miembros de la misma especie y la muestra de esperma se utiliza para fertilizar huevos puestos por gallinas que asimismo son miembros de la misma especie que los donantes del esperma. La presente invención también contempla el uso de esperma de una especie en un huevo de otra especie, en caso de que con ese esperma pueda fertilizarse el huevo.

Dado que habitualmente se prefiere que el esperma se emplee dentro de los 30 minutos de haber sido recolectado, el esperma anterior y asimismo el esperma congelado o mantenido con hielo seco puede usarse para los métodos de la invención, siempre que el esperma mantenga su capacidad de fertilizar un óvulo. Si el esperma ha de utilizarse más de 30 minutos después de su recolección, se prefiere combinar el mismo con un diluyente de esperma, como se describe a continuación.

Como antes mencionado la muestra de esperma también comprende un vehículo fisiológicamente aceptable. Conforme se utiliza aquí, un "vehículo fisiológicamente aceptable" es un líquido en el que el esperma mantiene su movilidad y viabilidad. Ejemplos de un vehículo fisiológicamente aceptable incluyen, sin limitarse a ello, semen no alterado, líquido seminal (sea originario del esperma o agregado), líquido transparente (sea originario del esperma o agregado), solución salina bufferizada, diluyente de esperma y combinaciones de los mismos. Preferentemente, se usará como vehículo un diluyente de esperma. Como ya citado, se prefiere especialmente el uso de un diluyente de esperma cuando el esperma recolectado no será utilizado para la fertilización dentro de los 30 minutos de su recolección. M.R. Bakst, en *Manipulation of the Avian Genome*, R. J. Etches y AM. Varrinder Gibbons, eds. CRC Press Boca Raton, FL págs. 15-28 (1993). Según se aplica aquí, un "diluyente de esperma" representa un vehículo

fisiológicamente aceptable utilizado para diluir una muestra de espermatozoides a fin de obtener una muestra de esperma de mayor volumen con menor concentración de espermatozoides. Preferentemente la composición del diluyente de espermatozoides extenderá la vida del espermatozoides, tanto como para diluir el espermatozoides, como para incrementar la cantidad de huevos que pueden fertilizarse con la cantidad de espermatozoides recolectado. Ejemplos de la composición de diluyentes de espermatozoides, proporciones sugeridas de dilución, períodos y condiciones óptimas de almacenamiento y fuentes comerciales de diluyentes pueden consultarse en Bakst ("Preservation of Avian Cells; en *Poultry breeding and Genetics*, R. D. Crawford (ed.) Elsevier, New York, págs. 91-108 (1990). Otro ejemplo de diluyente de espermatozoides es el diluyente de semen "Oviposited Chicken Eggs," diciembre 1988, Universidad Clemson). Otros diluyentes habitualmente utilizados en la industria avícola son 'Lago Formulation Avian Semen Extender' de 'Poultry Health Laboratories' en Davis, California, 'Beltsville Poultry Semen Extender' de 'Tri Bio Laboratories, Inc.' en State College, Pennsylvania. Según una realización preferida el diluyente de espermatozoides es Avidiluent. Avidiluent es producido por IMB, 10 rue Georges, Clemenceau, BP 81, 61302 l'Aigle, Francia.

Hasta ahora, en una realización, la muestra de espermatozoides puede comprender espermatozoides y líquido seminal, es decir, semen. Más aún, la muestra de esperma puede incluir espermatozoides y líquido seminal diluido en un vehículo fisiológicamente aceptable, incluyendo pero no limitado a una solución salina bufferizada y a un diluyente de espermatozoides.

La muestra de espermatozoides también puede prepararse según métodos sencillos para los expertos en el arte, tales como el lavado de semen de una o más aves con una solución, tal como solución salina bufferizada o un diluyente de espermatozoides, el posterior centrifugado de la solución resultante, la remoción de la capa superior y la resuspensión del espermatozoides lavado en una cantidad de solución, tal como

solución salina bufferizada o diluyente de semen. Un experto en el tema comprenderá con rapidez cómo obtener la concentración deseada de esperma a través de la resuspensión del esperma en la cantidad apropiada de solución. Por ejemplo, posteriormente al centrifugado y la remoción de la capa superior, el esperma concentrado puede pesarse a fin de estimar la cantidad de espermatozoides, aplicando valores conocidos en el pesaje de esperma avícola. El esperma puede después resuspenderse en la cantidad requerida a efecto de obtener la concentración deseada de esperma. Alternativamente, el esperma centrifugado puede resuspenderse, continuando con la remoción de la capa superior y después recentrifugarse, permitiendo la determinación del volumen concentrado de esperma. (Johnston, 1998). Subsecuentemente, la concentración del esperma puede calcularse aplicando la fórmula de Maeza y Buss (Poultry Sci. 55:2059 (1976)).

Habitualmente la concentración del esperma en semen de gallo varía entre 300 millones a 800 millones por milímetro, en semen de pavo de 800 millones a 1,5 billones por milímetro, en semen de patos Pekín de 20 millones a 600 millones por milímetro. La cantidad estándar de esperma utilizado para la inseminación artificial es de 100 millones en una cantidad total de 50 microlitros. Según el método de la presente invención, dado que el esperma se coloca directamente en forma adyacente al pronúcleo femenino, se requiere mucho menor cantidad de esperma para fertilizar el huevo. Por ello, en los métodos conforme la presente invención puede utilizarse hasta tanto como un solo espermatozoide. En realidad, en los métodos de esta invención puede utilizarse una amplia gama de concentraciones de esperma. En una realización el semen de gallo es diluido en una idéntica cantidad de Avidiluent y aproximadamente 0,01 milímetros de esta muestra de esperma se inyectan dentro del huevo. Así, aproximadamente 1 millón de espermatozoides serán depositados en forma adyacente al pronúcleo femenino.

De acuerdo a los métodos de la invención, la fertilización de un huevo de ave en su cáscara se cumple a través de la administración de la muestra de espermatozoides al interior del huevo. La administración de la muestra de espermatozoides puede cumplirse aplicando cualquier método que permita la introducción del espermatozoides al interior de la cáscara, incluyendo, pero no limitado a ello, la disolución de un sector de la cáscara con, p. ej., una solución ácida, el uso de electroporación a efectos de producir un orificio por penetración o fisurando un sector de la cáscara, utilizando, p. ej., una herramienta tal como una aguja o un escalpelo.

Preferentemente la superficie del sector de la cáscara a ser perforado a los efectos de administrar la muestra de espermatozoides es desinfectada antes de la administración, a fin de prevenir la contaminación del huevo. Para la desinfección de la cáscara puede utilizarse cualquier método compatible con la administración, incluyendo, pero no exclusivamente, el desinfectante IOFEC 200 y peróxido de hidrógeno al 3%. El lugar elegido para la perforación de la superficie del huevo debe lavarse o rociarse con el desinfectante o también puede sumergirse el huevo en un recipiente que contenga el desinfectante seleccionado.

Como ya descripto anteriormente, el orificio en la cáscara puede practicarse con una herramienta tal como un cuchillo o una aguja. Preferentemente debe usarse una herramienta estéril. Por ejemplo, en un procedimiento en dos etapas, en primer lugar puede realizarse un orificio en la cáscara utilizando un cuchillo u otro instrumento cortante. En un segundo paso, se introduce una aguja con una jeringa que contiene una muestra de espermatozoides por el orificio, a fin de administrar la muestra de espermatozoides en el interior del huevo. La introducción de la muestra de espermatozoides por el orificio de la cáscara también puede cumplimentarse por otros medios, incluyendo pero no limitándose a ello, el uso de una pipeta, tal como una micropipeta. Alternativamente en un solo paso, puede utilizarse una aguja insertada sobre una jeringa que contiene la muestra de espermatozoides para penetrar y así

producir el orificio en la cáscara y administrar por inyección la muestra de espermatozoos al interior del huevo. De ese modo la "apertura" puede implicar un orificio realizado por una aguja. Obviamente un experto en el arte, será capaz de elegir de grosor suficiente para permitir el pase de la muestra de espermatozoos a través de la aguja. En una realización, la aguja será del menor tamaño posible para administrar de modo intacto el espermatozoo al interior de la cáscara, siendo asimismo suficiente para penetrar la cáscara calcárea del huevo. Alternativamente, una aguja separada u otro medio puede usarse para realizar el orificio en la cáscara. Habitualmente pueden emplearse las agujas con una variación de grosor de 30 a 16. En una realización se utiliza una aguja de grosor 22. Un espermatozoo mide aproximadamente 0,5 μm en su parte más ancha y 100 μm de largo. Por ello, en una realización preferida, puede emplearse una aguja con un diámetro interno de al menos 10 μm para inyectar. En una realización, la aguja puede permanecer en la cáscara después de la inyección. Pueden usarse o adaptarse a la administración de espermatozoos variadas agujas y métodos utilizados actualmente para inyectar vacunas en los huevos.

El orificio puede realizarse en cualquier parte de la cáscara a los efectos de permitir la fertilización, pero habitualmente se efectúa en el sector de la cáscara cercano al disco germinal. Mientras que un huevo puede manipularse a fin de emplazar el disco germinal en diferentes lugares del huevo, en un huevo recién puesto, el disco germinal se localiza en el extremo más grueso del huevo, debajo de la cámara de aire adyacente al vitelo. Una vez ejecutado el orificio en la cáscara, la muestra de espermatozoos preferentemente se administra introduciendo una aguja, una pipeta, etc. a través de la cámara de aire y debajo de la membrana dispuesta por debajo de la misma (CPE). La cantidad de espermatozoos puede incrementarse o disminuirse, dependiendo del lugar y de la forma de administración del espermatozoo. En otra realización preferida, la muestra de espermatozoos

es administrada al interior del huevo usando una aguja. A fin de incrementar la eficiencia de la fertilización, puede efectuarse un tratamiento de la CPE. Puede aplicarse cualquier compuesto que provoque mayor permeabilidad de la CPE o membrana del vitelo, por ejemplo, un ácido no tóxico.

En una aplicación la aguja, pipeta, etc. es introducida a través de la cáscara en un ángulo de aproximadamente 15E, penetrando la membrana bordeando la cáscara. En un método conforme la invención, la aguja, pipeta, etc. puede introducirse a través de la cámara de aire hasta encontrarse con la membrana que encubre el vitelo y el disco germinal. Una persona práctica en el método según la invención sabrá en qué momento la punta de la aguja, pipeta, etc. se contactó con la membrana al sentir una leve resistencia para un posterior avance. Al continuar suavemente con la introducción de la punta, se vence la resistencia de la membrana, permitiendo el ingreso a la membrana. Entonces la muestra de espermatozoides puede administrarse en el interior del huevo de modo adyacente a la región de la membrana, la que es adyacente al disco germinal. Las cantidades habituales de muestra de espermatozoides sólo ascienden a 0,005 ml hasta 0,10 ml. Una cantidad promedio habitual de muestra de espermatozoides inyectada es de 0,01 ml.

Preferentemente a fin de prevenir la contaminación del huevo y la muerte del embrión, se sella el orificio en la cáscara. Puede aplicarse un adhesivo no tóxico directamente sobre el mismo a efectos de sellarlo. Alternativamente un trozo de cáscara de huevo puede usarse para obturar el orificio, pudiendo adherirse a la cáscara utilizando un adhesivo no tóxico. En una realización se usa el adhesivo no tóxico Elmer's® glue. Además puede emplearse cualquier "pegamento para tejido" para sellar el orificio. Un "pegamento para tejido" es un adhesivo estéril, no tóxico usado en procedimientos quirúrgicos para unir tejidos.

El método de la presente invención puede aplicarse para fertilizar huevos puestos de especies avícolas seleccionadas del grupo que consiste en pollos, codornices,

patos, pavos, faisanes, avestruces, emús, gansos, pavos reales, tetraos, mandúas, loros, cacatúas, cotorras y otras aves de valor comercial.

La presente invención asimismo provee un método de fertilización un huevo de ave en su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo encubierto por una membrana, así como el empollado de un polluelo vivo, que incluye la obtención de una muestra de espermatozoides que comprende espermatozoides de ave en un vehículo fisiológicamente aceptable, para la administración de la muestra de espermatozoides al interior del huevo, a fin de fertilizar el huevo, incubar el mismo hasta la salida del polluelo vivo del cascarón. El término "obtención" aquí utilizado incluye muestras de espermatozoides pre-realizadas y pre-administradas.

Después de que la muestra de espermatozoides fue administrada dentro del huevo acorde a los métodos de la presente invención anteriormente descritos, el huevo es incubado hasta que el polluelo vivo sale del cascarón. Una persona de suficiente experiencia conocerá el período de tiempo y las condiciones preferenciales para la incubación de un huevo fertilizado de cada especie en particular. Los siguientes son los períodos de incubación de un huevo fertilizado de distintas especies de aves. Pollos: 21 días, codornices: 23 días, codornices Cornix: 17 a 18 días, faisanes: 23 días, pavos: 28 días, patos 28 a 33 días, gansos: 28 a 30 días, cotorras: 18 días, loros: 28 días, palomas: 14 días, estorninos: 14 días, pinzones: 14 días, codornices Button: 16 días, codornices del valle: 21 a 22 días, cisnes: 30 a 37 días. La incubación de huevos fertilizados por estos métodos de la presente invención en comparación con huevos fertilizados naturalmente pueden diferir solamente en que el tiempo de incubación puede prolongarse a fin de incluir el período de tiempo que el huevo fertilizado habría estado dentro del útero de la hembra antes de poner el mismo. En una realización preferida, el período de incubación para huevos de gallina es de 21 a 23 días. Mientras que un experto en el arte rápidamente será capaz de determinar la temperatura óptima de

22

incubación de un huevo de una especie particular de ave, la temperatura habitual de incubación varía entre 95°F y 100°F. Un huevo de gallina será incubado a aprox. 99,5°F. En una realización aún mejor, la temperatura de incubación de un huevo de gallina será disminuida a medida que se acerque el momento de la rotura del cascarón por el polluelo. Así, en una realización actualmente preferida, un huevo de gallina es incubado a 99,5°F a partir del día 1 hasta aproximadamente el día 18 de incubación y a 98,5°F a partir del día 19 hasta la salida del cascarón.

Como bien se conoce en el medio, el porcentaje de humedad con el que se incuba un huevo puede revestir importancia para producir la salida del cascarón. Por ello, habitualmente el huevo se incuba con una humedad ambiental entre 75% y 90%. Preferentemente el huevo se incuba con una humedad aproximada del 80%. Mejor aún, el nivel de humedad al incubar un huevo debiera incrementarse al acercarse el momento de la salida del cascarón. De este modo, en una aplicación preferencial, un huevo de gallina se incuba en una humedad ambiental del 80% a partir del día 1 hasta el día 18 de la incubación y con una humedad del 85% a partir del día 19 hasta la salida del cascarón. En una realización específicamente preferida, se incuba un huevo a 99,5°F y 80% de humedad a partir del día 1 hasta el día 18 de la incubación, y a 98,5°F y 85% de humedad a partir del día 19 hasta la salida del cascarón. Como es harto conocido en el medio, girar los huevos durante la incubación es útil para fomentar el crecimiento del embrión.

Además se prefiere que la incubación de los huevos se efectúe en una incubadora de uso comercial. Varias empresas producen empolladoras e incubadoras de uso comercial, incluyendo PAS Reform, Jamesway, Chickmaster, Buckeye, Cumberland, Petersime, Humidaire Incubator Co., etc. Preferentemente los huevos son trasladados de una incubadora a una empolladora

aproximadamente 3 días antes de la salida del cascarón. La canasta de empollado permite al polluelo caminar inmediatamente después de salir del cascarón, lo que es necesario para el desarrollo y la viabilidad de los polluelos.

En otra realización, la presente invención provee un huevo de ave puesto que comprende un embrión nativo que presenta menos de 40.000 células, en donde el embrión puede convertirse en un polluelo vivo. "Nativo" significa crecer, vivir o ser producido en su lugar de origen. En consecuencia, un embrión nativo equivale a un embrión que se desarrolla y sale del mismo cascarón en el que se formó el pronúcleo femenino. Por ende, el embrión desciende del óvulo nativo. Desde que un óvulo fertilizado naturalmente es puesto por la gallina, el embrión en desarrollo presenta entre 40.000 a 70.000 células. De cualquier modo, el huevo de la presente invención es fertilizado después de haber sido puesto; así un embrión de la presente invención en evolución en el huevo, durante algún tiempo de su incubación presentará menos de 40.000 células. En realidad, en el momento de la fertilización, el embrión en el huevo acorde la presente invención será unicelular denominándolo cigote. Al crecer el embrión dentro del huevo, se produce la normal división celular y aumenta el número de células. Así, el huevo puesto fertilizado según la presente invención durante un tiempo comprenderá un embrión con, por ejemplo, 10.000, 20.000 o 30.000 células, incluyendo cantidades menores y aproximadas de células. Dos huevos de ave de preferencia comercial son los de gallina y los de pavo.

En otra realización, la presente invención provee un huevo de ave en su cáscara, que comprende un embrión con menos de 40.000 células (p. ej. 30.000, 20.000, 10.000, 1.000, 100 y 1 (cigote)), en donde el embrión puede convertirse en un polluelo vivo y en el que la cáscara presenta un orificio menor a 4 centímetros. En otra ejecución el orificio en la cáscara es menor a 2 centímetros y en una realización diferente el orificio en la cáscara es menor a 1 centímetro o 5

centímetros. En una realización, el orificio en la cáscara sólo presenta suficiente tamaño para introducir un aguja de grosor 22. Así, el orificio puede ser de cualquier tamaño entre el orificio más pequeño que permite la inyección del esperma hasta uno de menor tamaño que el orificio requerido para colocar nuevamente un óvulo fertilizado in vitro (es decir, fuera de la cáscara) dentro de la misma. El término "orificio" se refiere a una abertura realizada en algún lugar del huevo ya puesto. El "orificio" incluye un huevo, en el que la abertura fue sellada posteriormente. Por ejemplo, un huevo que presenta un orificio practicado por una aguja usada para inyectar esperma sellado posteriormente, aún después del sellado, continúa siendo por definición un huevo de ave con un orificio. El embrión puede ser o no ser nativo del huevo. "No nativo" incluye embriones desarrollados a partir de un óvulo no nativo de la cáscara, con la que fue puesta. Dos clases de huevos de preferencia comercial son los de gallina y de pavo.

De este modo, la presente invención provee un huevo puesto de ave en su cáscara, que comprende un embrión y un vitelo nativo con menos de 40.000, 30.000, 20.000, 10.000, 1.000 ó 100 células, incluyendo cantidades entre 1 a 40.000. Se entiende por "vitelo nativo" que el vitelo y la cáscara conforman el mismo huevo, que fue originalmente puesto.

Un huevo de la presente invención puede, por ejemplo, derivarse de especies de aves seleccionadas del grupo que consiste en pollos, codornices, patos, pavos, faisanes, avestruces, emús, gansos, pavos reales, tetraos, mandúes, loros, cacatúas, cotorras, cisnes, palomas y otras aves de valor comercial. En otra ejecución de preferencia comercial el huevo es derivado de especies avícolas usadas en los métodos de la presente invención y es seleccionado del grupo que consiste en gallinas, pavos, gansos, patos, codornices y faisanes. En una realización de aún mayor preferencia el huevo es derivado de una gallina. El método también utilizarse efectivamente en especies de aves en zoológicos, por

ej. para ayudar a preservar especies en peligro de extinción.

Los métodos de esta invención pueden asimismo usarse para la fertilización in ovo de huevos de reptil. Los huevos de reptiles, similares a los huevos de ave, comprenden un vitelo y un pronúcleo femenino y son protegidos por una cáscara al ser puestos. Un huevo puesto de reptil no fertilizado puede fertilizarse en su cáscara conforme los métodos de la presente invención. En particular se administra una muestra de esperma que comprende esperma de uno o más reptiles de la misma especie al interior del huevo puesto no fertilizado a través de un orificio producido en la cáscara y sobre el vitelo de modo adyacente al pronúcleo femenino, en donde se produce la fertilización.

El método de fertilización in ovo aquí descrito también aplicarse conjuntamente con otros procedimientos in ovo. Por ejemplo, puede vacunarse el embrión después de la fertilización. Tales procedimientos de vacunación son de conocimiento de los expertos en este arte. Alternativamente tal vacunación puede efectuarse simultáneamente con la fertilización in ovo, proveyendo de cualquier modo que la vacuna no previene el desarrollo embrional.

Adicionalmente la fertilización in ovo puede automatizarse de manera tal que los múltiples huevos son fertilizados simultáneamente, a través de, p. ej., técnicas de inyección. Así, 50, 100, 200, 300 o más huevos pueden inyectarse al mismo tiempo.

PARTENOGENESIS

En una realización de la presente invención la activación del huevo puesto no fertilizado es inducida por partenogénesis. El término "partenogénesis" significa la producción de células embrionarias de un gameto femenino en ausencia de contribución alguna de un gameto masculino.

En una realización preferencial la activación mediante partenogénesis de un huevo puesto de ave no fertilizado puede inducirse mediante la penetración de la

membrana que encubre al vitelo y el disco germinal, por ejemplo dirigiendo una aguja de grosor 25 a través de la cáscara al interior del huevo con el efecto de penetrar la membrana que recubre el vitelo. Preferentemente debe evitarse la fisura del vitelo. De tal modo la penetración y la rotura de la membrana que recubre el vitelo puede iniciar la activación del óvulo. Se contempla la utilización de otros medios mecánicos para introducirse en la membrana que recubre el vitelo. Por ejemplo láser, que incluye un láser YAG no térmico (yttrium-aluminium-garnet – silicato de itrio-aluminio), puede usarse para introducirse en la membrana que recubre el vitelo en lugar de emplear una aguja para tal procedimiento.

Está probado que el incremento pasajero de Ca^{2+} citosólico es el que inicia el programa del desarrollo del huevo. La concentración citosólica de Ca^{2+} puede incrementarse artificialmente inyectando directamente Ca^{2+} en el huevo o utilizando ionóforos portadores de Ca^{2+} , tales como A23187. Esto activa los huevos de cualquier animal examinado hasta ahora (Alberts, 1983). Previendo el incremento en Ca^{2+} mediante la inyección de quelante Ca^{2+} EGTA se inhibe la activación del huevo después de la fertilización. Dado que el incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} es transitoria, durando solamente dos a tres minutos posteriores a la fertilización, queda claro que no puede directamente influir sobre los sucesos observados durante las posteriores etapas de la activación del huevo, incluyendo la síntesis de ADN y de proteína. En lugar de ello el aumento de la concentración de Ca^{2+} solamente es útil para desencadenar la secuencia completa del desarrollo; algún otro cambio permanente debe ocurrir en el huevo mientras el nivel de Ca^{2+} sea elevado.

Dado que el mecanismo de activación no se interpreta por completo, queda claro que el espermatozoide únicamente es útil para impulsar un programa predeterminado en el huevo, no requiriéndose el espermatozoide mismo. Un huevo puede activarse por distintos tratamientos químicos o físicos no especificados. Estos procesos

generalmente son aplicados para aumentar el Ca^{2+} intracelular (Rickord and White, 1992). Por ejemplo, la perforación con una aguja puede activar un huevo de rana (Alberts, 1983). Los oocitos de ratón se activaron exponiéndolos a un medio libre de Ca^{2+} - Mg^{2+} (Surani and Kaufman, 1977), a un medio que contiene hialuronidasa (Graham, 1970), exponiéndolos a etanol (Cuthbertson, 1983), a ionóforos Ca^{2+} o quelantes (Steinhardt et al., 1984; Kline and Kline, 1992), a inhibidores de síntesis proteica (Siracusa et al., 1978) y a estimulación eléctrica (Tarkowski et al., 1970). Se reportó la activación de oocitos bovinos mediante etanol (Nagal, 1987), estimulación eléctrica (Ware et al., 1989), exposición a temperatura ambiente (Stice and Keefer, 1992), y una combinación de estimulación eléctrica y cicloheximidas (First et al., 1992; Yang et al., 1992). Estos métodos pueden aplicarse a huevos puestos de ave no fertilizados.

Una aplicación de la activación in ovo por partenogénesis es la rápida producción de líneas de crianza incestuosas puras. Actualmente la industria incluye el uso de diferentes combinaciones de líneas homocigóticas emparentadas para producir productos avícolas especiales para destino comercial. Se invierte mucho esfuerzo en la obtención, el mejoramiento y la mantención de estas líneas de pedigré. Mediante la partenogénesis puede inducirse un gameto femenino a convertirse en un polluelo vivo sin contribución genética de un macho. El polluelo resultante es completamente homocigoto en cada alelo. De este modo las líneas homocigotas de pedigré pueden crearse en una generación en lugar de los repetidos incestos requeridos actualmente. Además, en lugar de usar poblaciones de aves para derivar la línea homocigota, puede usarse un solo ejemplar superior. Dado que en una población de cría existen aves individuales que superan ampliamente el promedio, este método es el camino para obtener rápidamente los mejores rasgos genéticos en el producto final a comercializarse.

TRANSFERENCIA NUCLEAR

Puede utilizarse la tecnología de transferencia nuclear/micromanipulación celular a los efectos de activar un huevo puesto de ave no fertilizado. De este modo una realización contemplada por separado de la presente invención incluye la administración de líquido en suspensión que contiene células nucleicas o "nucleoplastos". Los nucleoplastos pueden generarse a gran escala aplicando determinados procedimientos de centrifugado de avanzada. En muchas especies tales como las ovejas, las vacas y los ratones se determinó que puede insertarse un nucleoplasto aislado a partir de una célula en otra célula enucleada con el propósito de generar un individuo clonado idéntico. Del modo aquí empleado la "transferencia nuclear" equivale a la remoción de un núcleo de una célula y la inserción de ese núcleo, también conocido como nucleoplasto, en otra célula de la cual el núcleo nativo se tornó inefectivo, por ejemplo por remoción. Los procedimientos aquí descritos permiten a los productores propagar eficientemente pedigrées genéticos superiores a lotes para destino comercial y se utilizan como base para el desarrollo de una plataforma instrumental automatizada de transferencia nuclear.

Las etapas primarias requeridas para la implementación de esta estrategia son las siguientes: (1) el desarrollo de líneas celulares y condiciones adecuadas para el cultivo de donantes de nucleoplastos; (2) visualización y ablación de estructuras nucleares dentro de óvulos y/o cigotas de ave; (3) aislamiento de donantes nucleicos; (4) transferencia de la donación nucleica al huevo (citoplastos). También puede llevarse a cabo la activación de óvulos reconstituidos llevando al desarrollo embrionario.

Células de Donante de Nucleoplasto. Las células madre embrionarias y las células germinales primordiales han demostrado permanecer omnipotentes en las gallinas y pueden utilizarse en un procedimiento de TN. Las gallinas clonadas así

generadas pueden resultar valiosas para su aplicación en determinados esquemas de cría de pollos. Alternativamente las líneas celulares somáticas pueden resultar ventajosas en otros casos de cría de pollos. Un factor en la selección de un tipo de célula somática es la capacidad de someterse a una "reprogramación". La reprogramación es requerida a efectos del nucleoplasto para contribuir con todas las líneas celulares embrionarias, llevando así a un desarrollo embrionario normal. Los fibroblastos embrionarios cultivados (FEC) han sido ampliamente utilizados en mamíferos con buenos resultados debido a su simple manipulación genética. Los FEC pueden usarse para la transferencia de núcleos celulares somáticos en el sistema avícola. Alternativamente se cultivaron las células blastodérmicas derivadas de embriones, las que pueden usarse. Otro tipo celular que puede emplearse con la plataforma de transferencia nuclear en aves son las células B avícolas.

Una ventaja de emplear células B de ave es su capacidad de someterse a elevados niveles de recombinación. Esta capacidad puede resultar importante porque le confiere mucho mayor eficiencia al proceso de obtención de ADN exógeno incorporado al genoma de ave.

Las modificaciones introducidas en cualquiera de estas líneas celulares en vitro posteriormente son incorporadas al genoma del ave resultante. Pueden efectuarse estudios a fin de identificar el tipo más ventajoso de célula. Por ejemplo, los nucleoplastos pueden crearse a partir de estos tipos de células y transferirse al citoplasto del ave (célula receptora). Estos tipo de células que llevan al mayor índice de supervivencia embrionaria, pueden incorporarse a la plataforma tecnológica estándar.

Se ha llevado a cabo exitosamente la transferencia nuclear en mamíferos, usando ambos, huevos y cigotas, aunque predomina el uso de huevos para estos propósitos. Los procedimientos estándar de transferencia nuclear requieren la

remoción o la ablación de los núcleos celulares existentes, preferentemente antes de introducir los núcleos donados. Esto permite que el núcleo introducido se someta a una réplica normal de ADN sin interferencia del núcleo nativo. Los huevos de ave son grandes y la distancia entre el núcleo donado y el núcleo de la célula receptora es suficientemente grande, de modo que no resulta estrictamente necesaria la remoción del núcleo de la célula receptora. De cualquier manera, es preferible que se produzca la enucleación.

El núcleo celular en un huevo de ave se presenta oscurecido por densos gránulos de vitelo resultando bastante inefectiva la visualización bajo el microscopio. Por ello, el método de selección para enuclear un óvulo de ave requiere el uso de la rotulación nuclear fluorescente. Pueden emplearse los habituales tintes nucleares fluorescentes, como Hoescht 33342 (bis-benzamida) y DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol, hidroclouros) por su capacidad de generar una máxima visualización de los núcleos y su ADN asociado.

Pueden utilizarse dos estrategias estándar para la enucleación: 1) la remoción mediante una micropipeta de vidrio o 2) la ablación mediante láser. Actualmente se utilizan ambas estrategias para la micromanipulación celular. El tipo de rayo láser y la longitud de onda pueden determinarse empíricamente. La eliminación del área fluorescente dentro del citoplasma a través de cualquiera de los métodos indicaría la remoción del núcleo. En esta etapa es importante no sólo remover el ADN nuclear, sino también la maquinaria que lo origina.

Una cantidad de factores influyen sobre el desarrollo después de efectuada la transferencia nuclear, incluyendo la exigencia de que el embrión reconstruido mantenga una ploidía normal. Al transferir un núcleo de una célula que comenzó a diferenciarse, el modelo de expresión genética puede "reprogramarse" desde un tipo de célula diferenciada un pequeño embrión. Los ensayos, en los que se varió el ciclo celular, también sugieren que la eficiencia de este proceso recibe la

influencia de ambos, del donante y del estado del ciclo de la célula receptora.

En mamíferos resulta aparente que la replicación de ADN que se produce en el embrión reconstruido influye en el estado del ciclo de la célula receptora del donante, así como en la célula receptora. Debido a la influencia del factor de promoción de meiosis (FPM) en el citoplasma, la célula receptora podría ejercer mayor influencia (Barnes et al., 1993; Campbell et al, 1993). Puede aumentar la actividad del FPM durante la replicación al formarse los husos, pudiendo continuar elevada durante la metafase II. La transferencia nuclear a un citoplasma con un elevado nivel de FPM puede conllevar al colapso de la membrana nuclear, la condensación de cromosomas, la modificación de la membrana nuclear y la replicación de ADN sin desmedro del estado del ciclo celular del núcleo donante. En contraste, el núcleo determina en donde se produce la replicación de ADN siguiente la transferencia de un oocito con un bajo nivel de actividad de FPM (Campbell et al, 1993, 1994). Se cree que a partir de este trabajo se producen dos efectos: 1) una mayor oportunidad de reprogramación de la expresión genética durante etapas específicas del ciclo celular; y 2) un beneficio de la transferencia a fases similares del ciclo celular.

Se ha demostrado que aumenta el desarrollo embrional cuando los núcleos donados se encuentran en la fase G0 o G1 del ciclo celular. En la oveja Dolly desarrollada a partir de un oocito enucleado con un derivado de célula mamaria, se presume que se encuentra en G0. De este modo células Cumulus en los estados G0 y G1 fueron usadas para realizar la transferencia nuclear de células somáticas en ratones (Wakayama, et al, 1998). De cualquier modo se produjeron terneros clonados usando núcleos de células donantes no latentes (Cibelli et al, 1998). Esto indica que las exigencias para una exitosa transferencia nuclear en aves deberá determinarse empíricamente. Pueden utilizarse células en varios estados de ciclos celulares a fin de determinar el protocolo óptimo. Se realizó la

administración de núcleos donados a través de la electrofusión de las células donantes para enuclear los huevos/cigotos y a través de la inyección directa de núcleos donados en huevos enucleados. Dado el gran tamaño de huevos de ave y la facilidad de efectuar inyecciones, la introducción directa del núcleo donado podría ser el método óptimo de administración. Cuando la transferencia nuclear es realizada en óvulos en la metafase II, habitualmente se requiere la activación artificial del óvulo. Esto puede efectuarse en distintos intervalos de tiempo partiendo de la simultaneidad hasta varias horas posteriormente a la transferencia nuclear. Estos mismos parámetros pueden estudiarse para el tiempo óptimo de activación.

Puede diseñarse un sistema de alta eficiencia para realizar el proceso. Esto contiene el potencial de eliminar una ronda completa de la industria avícola denominada "cría de reproducción". Habitualmente en la cría de reproducción se requieren varias generaciones a fin de llegar de las líneas de pedigrí a través de varias generaciones, a los padres y finalmente a las aves para fines comerciales. Para el éxito de este proceso se requieren poblaciones enteras de aves. De la AIO con transferencia nuclear puede resultar el producto final de salida comercial a partir de una solo individuo superior. El efecto de red permite producir lotes de aves genéticamente superiores en una operación de crianza extremadamente eficiente. Además, las células utilizadas para la transferencia nuclear o celular pueden almacenarse indefinidamente hasta que un determinado producto final es requerido por el usuario. Un beneficio de idéntica importancia puede ser la capacidad de producir lotes completos de aves unisex. Por ejemplo, los productores de gallos pueden requerir todos los lotes de machos para una incrementada eficiencia de crecimiento, mientras que los productores de huevos obviamente preferirían todos los lotes femeninos.

En otro aspecto de la presente invención, las formulaciones líquidas también

pueden incluir células y/o núcleos celulares en suspensión para utilizarse en la generación de animales quiméricos y/o clonados. Se han inyectado células, tales como células blastodérmicas de ave, en embriones de ave con el expreso propósito de generar aves quiméricas.

TRANSGENESIS

La presente invención asimismo provee un método para producir un embrión de ave que contenga ácido nucleico heterólogo a efectos de activar, es decir, fertilizar un huevo de ave a través de los métodos aquí explicados de la presente invención e introducir un ácido nucleico heterólogo dentro del huevo de ave. Como usado aquí, el ácido nucleico incluye, pero no está limitado a ADN, cADN, RNA, mRNA y RNA antisentido. Los ácidos nucleicos pueden ser de ramificación simple, doble o múltiple. Ácidos nucleicos heterólogos pueden incluir ácidos nucleicos no propios de la especie avícola y ácidos nucleicos no expresados normalmente en la ubicación introducida en la célula o en el núcleo de la especie de ave.

Después de que un huevo ha sido activado por AIO, se puede tener acceso al embrión en cualquier estado de su desarrollo a fin de manipular genéticamente algunas o todas sus células. De gran interés para la creación de aves transgénicas es el embrión pequeño. El AIO permite la transmisión de línea germinal para el ácido nucleico heterólogo al permitir la introducción lo más temprana posible de ácido nucleico en el pequeño embrión de ave. Esta manipulación genética del embrión en desarrollo, puede, por ejemplo, producir aves transgénicas que comprenden material genético que puede usarse para modular ADN endógeno y su expresión y para crear células que pueden producir proteínas comercialmente valiables para uso comercial.

La transferencia de un ácido nucleico a un genoma de ave puede llevarse a cabo por una persona experimentada en el arte conforme varios métodos conocidos.

(Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Lennette et al, Manual of Clinical Microbiology, ed. 14, Amer. Soc. for Microbiology, Washington DC, 1985; Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; Antisense RNA and DNA, D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988). Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 2^a edic., Alan R. Liss, Inc., New York (1987); Centers for Disease Control Laboratory Manual, U.S. Department of Health, Education and Welfare Pub. Nr. 79-8375, p. 75, Centers for Disease Control, Atlanta, GA; Fundamental Virology, 2^a edic. Bernard N. Fields and David M. Knipe, Chief Eds., Raven Press: New York, 1990).

Ejemplos de métodos de transferencia de material genético al genoma de ave incluyen, sin limitarse a ellos, el 'avian leukosis virus' (ALV), la transgénesis mediada por transducción, la transgénesis mediada por transposón, la transgénesis mediada por células blastodérmicas, la transgénesis mediada por células primordialmente germinales y la transferencia nuclear. El ácido nucleico heterólogo puede introducirse al embrión simultáneamente con la producción del evento activador, por ejemplo, al mismo tiempo que se introduce la muestra de espermatozoides al huevo o en una etapa posterior del desarrollo embrionario.

Un método estándar en uso actualmente para producir aves transgénicas es la producción de partículas transducidas derivadas de la replicación deficiente de ALV que comprenden una inserción de ADN.

Debido a que las partículas no son capaces de replicación en el ave, no existe riesgo de causar viremia o enfermedad en el ave o en los seres humanos. Una abertura puede generarse justo por encima del embrión transduciendo partículas introducidas en la cavidad subgerminal del embrión. Posteriormente se sella la abertura y los huevos se ubican en incubadoras para su desarrollo.

Otro método usado para la transferencia de ácido nucleico heterólogo al genoma de ave es la transgénesis mediante transposón. Los transposones son elementos genéticos capaces de translocar o moverse dentro del genoma de sus especies huésped. No se conocen transposones que se desenvuelven en especies de ave. Sin embargo quedó demostrado que determinados transposones reconstituídos de otras fuentes son capaces de funcionar dentro del genoma de ave. Esos transposones pueden someterse a ingeniería, como para servir de útiles sistemas vectores de ácido nucleico para insertar genes en el genoma de ave.

Más allá, otro método para la introducción de ADN heterólogo en un embrión de ave es la transgénesis de células blastodérmicas. Las células blastodérmicas u otras células de las primeras etapas pueden tomarse de embriones en la etapa X (el estado embrional, en el que es puesto un huevo fertilizado), pueden reinyectarse en embriones receptores, donde se radican y crecen, dando origen a pollos quiméricos. Un pollo "quimérico" se compone de células de dos diferentes linajes genéticos. Células blastodérmicas inyectadas en embriones huésped irradiados, poco después de su aislamiento presentan la capacidad de aportar a todos los tejidos del ave resultante incluyendo la línea germinal (células que dan origen a espermatozoides y huevos y así a todas las generaciones subsiguientes). Se cultivaron células blastodérmicas y se transfectaron con ADN mediante varios métodos conocidos por personas expertas en el arte en un intento de generar aves transgénicas.

Así, las células blastodérmicas o las células madre embrionarias pueden inyectarse en un embrión fertilizado in ovo para crear pollos quiméricos. Esos pollos quiméricos pueden luego ser cruzados y se puede crear un clon de la célula originariamente inyectada, asumiendo que aquellos presentan una transmisión de línea germinal de las células blastodérmicas o de células madre embrionarias.

Además la transgénesis mediada por células primordialmente germinales puede utilizarse para generar aves transgénicas. A medida que el embrión en desarrollo crece, ciertas células son destinadas a la línea germinal para dar origen al espermatozoides y los huevos. Esas células primordialmente germinales migran hacia la saliente genital de la gónada en desarrollo, donde permanecen latentes hasta que el ave alcanza madurez sexual. Una aproximación a la transgénesis de aves es aislar aquellas células primordialmente germinales, manipularlas genéticamente y reintroducirlas en un embrión en crecimiento para su desarrollo continuado. Esta aproximación técnica es comparable a la aproximación de la célula blastodérmica, tanto en la extensión, en la que se desarrolla como en sus potenciales aplicaciones. Las células primordialmente germinales demostraron su contribución a la línea general, tal como las células blastodérmicas, cuando son inyectadas a embriones huésped.

Otro aspecto más de la presente invención se relaciona con las fórmulas del líquido administrado al huevo de ave que provee información vital respecto del status genotípico o constitución individual de cada ave. Por ejemplo, pruebas de ADN y/o ARN pueden administrarse en un huevo de ave con el propósito de clasificar embriones según su sexo o cualquier otro genotipo. Esas pruebas persiguen específicamente sus objetivos secuenciales y proveen información específica respecto de la estructura genética del ave. Rotular las pruebas con varias moléculas fluorescentes, radioactivas o quimioluminiscentes permite una tecnología altamente confiable para determinar el status genotípico. Alternativamente, anticuerpos u otras proteínas pueden utilizarse de manera similar como moléculas referentes.

El uso de la presente invención incorpora ácidos nucleicos en oocitos monocelulares y embriones pequeños, permitiendo la incorporación de ADN exógeno a todas o a la mayoría de las células del ave resultante. Sin embargo en

una realización alternativa, la presente invención puede adaptarse para administrar esos ácidos nucleicos y sus vectores a embriones en estadios más avanzados. Un método corriente para la producción de aves transgénicas comprende la inyección de partículas virales a la cavidad subgerminal de los embriones de ave en desarrollo. Otra aplicación podría ser para la expresión transitoria de un determinado producto genético en el embrión de ave. Pueden administrarse fórmulas de ácido nucleico con la intención específica de generar huevos y/o sistemas biorreactores de origen animal. También pueden administrarse al embrión a fin de afectar la conformación genética proteínas, antígenos y anticuerpos.

Los métodos de activación in ovo aquí descriptos también pueden utilizar en combinación procedimientos in ovo. Por ejemplo, el embrión puede vacunarse después de la fertilización. Alternativamente tal vacunación puede darse simultáneamente con la fertilización in ovo, asegurándose de que la vacuna no interfiera en el desarrollo del embrión.

AUTOMATIZACIÓN

La AIO puede automatizarse de modo tal de fertilizar múltiples huevos de forma simultánea a través de, por ejemplo, técnica de inyección. Así, 50, 100, 200, 300 o más huevos pueden inyectarse simultáneamente. Será simple para aquellos expertos en el arte que el método de la presente invención es de sencilla aplicación en una operación industrial de gran escala, aplicando la automatización para activar huevos recién puestos. En concordancia, un aparato previamente utilizado, por ejemplo, para inmunizar huevos puestos y fertilizados puede adaptarse para en lugar de ello introducir una muestra de espermatozoides, los núcleos o adaptarse para la paratogénesis a fin de automatizar el procedimiento de AIO.

Como los expertos en el arte podrán apreciar, las tecnologías de manipuleo automático de huevos ha sido desarrollado simultáneamente por varios inventores

independientes en todo el mundo. La tecnología actualmente existente aporta sistema de alto rendimiento para inyectar sustancias líquidas en huevos embrionados de ave. Los ejemplos incluyen la inyección de vacunas a fin de incrementar el estado de inmunidad de los polluelos resultantes, la inyección de virus para la producción de vacunas para seres y animales y la inyección de proteínas para influir en la salud, el crecimiento y la apariencia de las gallinas y pollos. Otro sistema automatizado de utilidad para la producción avícola permite la detección de embriones de pollo vivos y muertos, basado en la transiluminación con diferentes recursos de luz y diferencias de temperatura entre los huevos adyacentes en una bandeja. Estas tecnologías, consideradas conjuntamente, representan un actual estado de desarrollo en este campo. Sin embargo, existe la necesidad de una plataforma más avanzada adaptada específicamente a las necesidades de criadores avícolas, una necesidad que la presente invención considera y satisface.

Recientes progresos en el área de la preservación del espermatozoides, tomados conjuntamente con el advenimiento de la tecnología de FIO, hicieron posible encarar un modelo de dirección mucho más eficiente para operaciones de crianza de pollos. Varias de las importantes tecnologías genéticas abajo descriptas pueden unirse a fin de crear una plataforma verdaderamente versátil para la automatización de la tecnología de cría de pollos.

A los efectos de implementar la AIO, es decir, la FIO, en una versión automatizada, se contemplaron dos etapas. La primera etapa implica el cálculo de la cantidad de células de espermatozoides en la muestra de espermatozoides, o la muestra que contiene células o material nuclear para transferir que son cargadas en la máquina. Este punto puede resolverse mediante el uso de una unidad integrada de espectrofotómetro (a veces denominado densímetro), similar a aquellos comercializados por Animal Reproduction Systems of Chino California y otros. La

información obtenida de este análisis se reporta a una unidad de procesamiento central u a otro sistema de analizado, en el que se determinan las cantidades óptimas de espermatozoides y diluyente de semen o de células y material nuclear. Esta información es posteriormente trasladada a un mecanismo expendedor de líquido con el resultado de que los volúmenes correctos de líquido serán vertidos en un depósito central de un mecanismo para inyección de huevos o un sistema similar. Para el segundo paso, la unidad de procesamiento central activa el mecanismo de inyección, el que administra el monto apropiado de muestra de espermatozoides diluido o las fórmulas de células o material nuclear al huevo no fertilizado en la profundidad específica y en el ángulo apropiado para completar la AIO ó la FIO. El proceso de inyección incluye la perforación de la cáscara de huevo mediante un punzón tubular y la inserción de una aguja de inyección a través de la membrana vitelina para administrar la fórmula de la muestra.

El mecanismo de inyección al huevo puede presentar un diseño similar a aquellos producidos y comercializados por Embrex, Inc., Merck Inc. y otros en la industria. A modo de ejemplo se incluye un diseño en la patente US Nº 4.903.635 titulada "Sistema de inyección de alta velocidad para embriones de ave", que se incorpora aquí a modo de referencia. Como se describe en la patente, el dispositivo patentado es un sistema automático de inyección de alta velocidad para embriones de ave, que puede inyectar sustancias líquidas a huevos, específicamente un líquido inoculador. La máquina incluye dispositivos de succión que levanta los huevos de sus soportes con superficies que no les infrijan daño alguno, antes de proceder a la inyección. Posteriormente la máquina está provista de mecanismos separados y dispositivos para en primer lugar realizar un orificio en la cáscara de huevo y posteriormente inyectar el embrión de ave o el ambiente circundante con una sustancia líquida, evitando el uso de una sola aguja o punzón para realizar un orificio en la cáscara del huevo y administrar la

substancia fluida al interior del mismo. Como también se conoce en el ambiente, la presente invención contempla el empleo de una sola aguja para perforar la cáscara y administrar las sustancias fluidas. Otras patentes relevantes que presentan la inyección de fluidos a huevos incluyen la patente U.S: N° 5.900.929, titulada "Método y Aparato para la Inyección Selectiva de Huevos de Gallina"; la N° 5.722.342, titulada "Tratamiento Ovo antibiótico y microbiano para disminuir poblaciones de salmonellas en aves"; la N° 5.699.751 titulada "Método y Aparato para Inyección In ovo"; la N° 5.438.954, titulada "Método y Aparato para Inyección In ovo de pequeños embriones"; la N° 5.339.766, "Método para Introducir material en huevos durante el temprano desarrollo embrional"; N° 5.176.101 "Sistema de Inyección Modular para embriones de ave"; N° 5.158.038, "Método para Inyección de Huevos, Aparato y Solución Vehículo para mejorar el empollado y las Enfermedades"; la N° 5.136.979, "Sistema de Inyección modular para embriones de ave", todas ellas incorporadas para su referencia. En la ejecución más sencilla para la FIO, el espermatozoide es substituido por antígeno en esas máquinas y la profundidad de la inyección se ajusta a fin de cumplir con la FIO.

El proceso de AIO ó FIO posibilita el diseño de sistemas con capacidad para operaciones de alto rendimiento para la activación, es decir, la fertilización de huevos de ave después del empollado. Ventajosamente la presente invención para FIO requiere mucho menor cantidad de espermatozoide a causa del método de fertilización directa, posibilitando la operación continua y reduciendo drásticamente la cantidad de machos en el esquema de cría. Los machos restantes pueden alojarse en forma centralizada, proviendo suficiente espermatozoide fresco directamente a la empolladora para fertilizar los billones de huevo empollados en la industria cada año. El empleo de menor cantidad de machos permite a los criadores realizar progresos más veloces para mejorar sus líneas usando solamente los animales verdaderamente de élite para la inseminación.

Además la infraestructura de la industria puede racionalizarse basándose en la eliminación o en la significativa reducción de machos. Por ejemplo, puede llevarse a cabo una operación de producción comercial de huevos mucho más eficiente, substituyéndola directamente por las instalaciones para empollado de huevos, dado que sólo se requieren huevos sin fertilizar. En el programa de Inseminación artificial, en el que las hembras representan aproximadamente el 95 a 98% del lote, será posible eliminar la necesidad de inseminación manual, reduciendo por ende aproximadamente el 95% de la mano de obra requerida para esos programas.

Desde la activación automática mediante la transferencia nuclear, se puede posteriormente adaptar el mecanismo de Inyección del huevo a fin de incluir la eliminación de los núcleos nativos no efectivos. Por ejemplo, el mecanismo puede incluir una micropipeta o un láser para remover o interpretar los núcleos nativos no efectivos.

Adicionalmente a la activación, es decir, vía fertilización se contempla que la presente invención además incluya los procesos de análisis genético, de manipulación y propagación. Como un experto en el arte podrá apreciar, estas herramientas se diseñan actualmente para su uso en laboratorio requiriendo técnicos de alta especialización y siendo en concordancia, impracticable su uso habitual en la industria avícola de reducido margen. De la forma implementada en la presente invención, varias de esas tecnologías pueden incorporarse a una plataforma totalmente automática para ser usado por personal de producción, tanto como por genetistas y otros científicos.

La presente invención puede diseñarse para incluir mecanismos adicionales y etapas para administrar diversas formulaciones líquidas con la intención de a) impactar la expresión genética en el embrión de ave concurrentemente con o subsecuentemente a la activación in ovo, es decir FIO y/o b) proveer información

vital respecto del status genotípico del embrión. El dispositivo de administración puede parecer similar al mecanismo de inyección a huevos para la administración de espermatozoides detallado más abajo. La presente invención puede emplear un depósito común para líquido conteniendo el espermatozoides o un reservorio independiente del espermatozoides, en el que agujas separadas se insertan en el huevo para cada líquido o siendo los líquidos inyectados secuencialmente a través de una sola aguja insertada en el huevo.

La presente invención también contempla la incorporación de un mecanismo de detección para soporte en varios tipos de análisis genéticos y proteicos. Una realización de este mecanismo incluye el uso de una fuente de luz de longitud de onda apropiada, como por ejemplo, un láser y un correspondiente dispositivo de tinte expresado en forma diferenciada en el huevo de ave como indicador de determinados estados genotípicos o fisiológicos. Por ejemplo, esta realización puede clasificar huevos según el sexo empleando pruebas de rotulación fluorescente, promotores y sistemas de expresión indicadores del sexo, anticuerpos de rotulación fluorescente para determinar el sexo y otros.

El mecanismo de detección puede, por ejemplo, usar una cámara CCD u otro detector apropiado de señales fluorescentes a fin de activar una clasificación y/o identificar un mecanismo. En otra realización, el mecanismo de detección puede emplear un contador por centelleo para radioactividad y/o un método de detección basado en la quimioluminiscencia para los mismos propósitos generales antes descritos. En otra ejecución el sistema puede utilizar 'chips genéticos', tecnología de micro y macrocomposición genética para fines de detección, un ejemplo es el producido por la empresa Affymetrix.

Como podrá apreciar un experto, la clasificación de las aves según el genotipo puede aplicarse en operaciones de producción. La clasificación por el sexo permite la optimización de la capacidad productiva. Esto significa, los machos son

requeridos en la industria de los pollos, mientras que las hembras se necesitan como ponedoras. Además la presente invención al proveer facilidades a los genetistas para realizar selecciones genéticas basadas en la identificación automática de alta velocidad y la clasificación genotípica de huevos, redunda en mayores progresos genéticos, en el desarrollo de líneas mejoradas de crianza de aves.

Independientemente del tipo de detección utilizada para la clasificación genotípica, otro diseño contemplado se ocupa de clasificar cada huevo en 'vivo' o 'sin vida'. También se incluyeron mecanismos de iluminación y/o temperatura para este procedimiento, como ya incorporado en sistemas existentes en PAS Reform, Breull, y en Embrex. Con respecto a este aspecto de la presente invención, la patente US N°5.900.929 asignada a Embrex se incorpora a título de referencia.

Acoplado a los dispositivos de clasificación antes enunciados, la presente invención al inyectar las fórmulas líquidas que aseguran un indicación predeterminada y la detección, provee asimismo una plataforma versátil para todo tipo de aplicaciones de detección molecular.

Otra ejecución de la presente invención incorpora un dispositivo de muestras de líquido para obtener muestras de líquido de los huevos de ave. Este diseño utiliza una línea de vacío comunicada con la aguja de muestreo, la punta de la cual se presume recubierta por la porción de líquido del respectivo huevo de ave, para su posterior remoción del mismo. Alternativamente el diseño puede usar un gradiente electro-osmótico, similar al utilizado en analizador genético PE Biosystems 310 para aspirar muestras de líquido dentro de un capilar de muestreo.

A fin de utilizar al máximo el /los mecanismo/s de detección, a veces puede resultar necesario amplificar la señal con varias técnicas. Una realización para la amplificación de la señal de detección puede ser la incorporación de una unidad térmica integrada de ciclaje, tal como la producida por PE Biosystems, Hybaid MJ

Research y otros para la amplificación de ADN. Este dispositivo, si bien es de importancia, no es esencial para el uso de chips genéticos, y el antes mencionado dispositivo de genotipificación basado en la micro y macro composición.

Para obtener información más detallada de las muestras a ser analizadas también se contempla la separación de moléculas de muestra por tamaño, peso molecular, carga eléctrica u otras propiedades químicas y físicas. Una realización de estos mecanismos de separación es una unidad de electroforesis. Por ejemplo una unidad integrada de electroforesis capilar tal como o similar a la 310 Genetic Analyzer producido por PE Biosystems, podría utilizarse para separar los ácidos y las proteínas nucleicas. Esta realización de la presente invención podría por ejemplo ser útil para la genotipificación de alto rendimiento de huevos de una línea de pedigree de aves de un criador primario.

Finalmente los datos obtenidos mediante la realización anterior en forma individual o colectiva pueden procesarse por el software en una unidad procesadora central u otro dispositivo para evaluar el valor y el status de huevos a medida que dejan la línea de procesamiento. Los huevos examinados pueden rotularse, clasificarse y transferirse adecuadamente a canastos de empollado o bandejas. El rotulado puede efectuarse mediante un mecanismo de chorro de tinta similar al aplicado por las impresoras de Hewlett Packard y Epson. La clasificación y el traspaso de los huevos pueden realizarse por bocas de succión automática y cintas transportadoras que llevan las bandejas por la instalación hasta los carretes preparados. Los mecanismos para esta parte del equipo pueden aplicar diseños similares a los sistemas manufacturados y comercializados por Breull, Kuhl Corporation, Pas Reform y Embrex.

La plataforma del equipo aquí descrita también se beneficiaría con determinadas capacidades de análisis genético y proteico existentes. Incorporando directamente las capacidades de análisis a la plataforma, estos procedimientos podrían

realizarse a alta velocidad y a escala industrial. Se describen ejemplos de los que surge esta capacidad de análisis directamente aplicable a la industria avícola.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se brindan a fin de demostrar aquellos de uso habitual en el ambiente incluyendo una completa explicación y descripción de la forma de implementar los métodos aquí reivindicados, citándose los mismos sólo a modo de ejemplo de la invención, no constituyendo de modo alguno una limitación de la envergadura, que los autores asignan a su invención. Aunque se ha tratado de enunciar las cifras con la mayor exactitud posible (p. ej. cantidades, temperatura, etc.), pueden haberse deslizado algunos errores y desviaciones. Salvo indicación en contrario, las partes se indican por su peso, la temperatura es en °F y la presión es la atmosférica o similar.

EJEMPLO

1. Cuarenta y tres huevos no fertilizados de gallina Barred Rock recién puestos se desinfectaron lavando la cáscara con peróxido de hidrógeno al 3% y se colocaron en estantes.
2. En la misma mañana se obtuvo espermatozoos de 4 gallos Barred Rock y se lo recolectó en viales Vacutainer® menos de una hora antes de realizar el procedimiento de fertilización.
3. Se almacenó el espermatozoos de los 4 gallos y se lo mezcló con 1 ml de Avidiluent®.
4. El espermatozoos mezclado con el Avidiluent® se colocó en una jeringa de 1 ml a través de una aguja de 1", grosor 22, a fin de formar una muestra de espermatozoos.
5. Con la aguja se efectuó un orificio en el extremo más ancho de la cáscara de huevo y se introdujo la misma en un ángulo de 15° con la superficie de la cáscara.
6. Se traspasó la aguja a través de la cámara de aire hasta introducir sólo la

- punta en la membrana que encierra el vitelo y el disco germinal.
7. Se inyectó una gota, 0,05 ml de la muestra de espermatozoides sobre la superficie del vitelo de modo adyacente a la membrana.
 8. Se retiró la aguja con la jeringa del huevo.
 9. El orificio producido en la cáscara por la aguja se obturó con un pequeño trozo de cáscara, asegurando el trozo a la cáscara con un adhesivo similar a Elmer's glue®.
 10. Se colocaron los huevos en incubadoras de uso comercial manteniendo la temperatura a 99,5°F con un 80% de humedad a partir del día 1 hasta el día 18 de incubación. Los huevos se giraron de acuerdo a los métodos habituales en el ambiente y aplicados en incubadoras de uso comercial.
 11. El día 19 los huevos se traspasaron a empolladoras de uso comercial y se mantuvieron a 98,5°F y 80% de humedad hasta la salida del cascarón.
- Dies días después de que el método de fertilización de la presente invención fue aplicado en 43 huevos, se efectuó el transiluminado habitual en los huevos a fin de determinar, cuáles habían sido fertilizados con éxito. Treinta y cinco huevos de los iniciales 43 estaban fertilizados. De los 35 huevos fertilizados, pudieron empollarse 32 y todos los polluelos salvo uno fueron sanos. En consecuencia, 72% de los 43 huevos puestos tratados con el método de fertilización de la presente invención produjeron un polluelo vivo y saludable.

EJEMPLO 2

Datos de gallinas Hyline ponedoras de huevos de color de venta en el mercado:

1. Se recolectaron 270 huevos recién puestos a las 6.30 AM.
2. Inmediatamente se recolectó semen de machos Black giant agregando diluyente en una proporción 50:50.
3. Los huevos y el semen se entregaron al laboratorio dentro de los 20 minutos de recolección de semen.

4. Los huevos se dividieron en dos grupos de 135 huevos cada uno, a fin de realizar un control experimental y negativo.
5. Los huevos del control experimental se inyectaron como descrito previamente con 10 μ l de la dilución de semen preparada.
6. Los huevos del control negativo no se inyectaron.
7. Los huevos inyectados se sellaron con siliconas y se colocaron en la incubadora como anteriormente descrito.
8. Al cabo de 5 días se controló y registró la fertilidad.
9. Se determinó que en el grupo experimental 33 huevos de los 135 iniciales (24%) estaban fertilizados. Ninguno de los huevos de control negativo demostró signos de desarrollo.

EJEMPLO 3: PARTENOGENESIS

1. Se recolectaron 270 huevos recién puestos en la mañana.
2. Se dividió los huevos en dos grupos de 135 cada uno para el control experimental y el negativo.
3. Se practicó un orificio de 2-3 mm en la cáscara de huevo y las membranas a modo de quedar visible el vitelo.
4. Se perforó suavemente la membrana que envuelve el vitelo y el disco germinal, teniendo cuidado de no rasgar el vitelo. (Alternativamente, el orificio y la perforación de la membrana del vitelo puede llevarse a cabo simultáneamente mediante la simple inserción de una aguja de jeringa de grosor 25 a través de la cáscara y dentro del vitelo).
5. Después del tratamiento los huevos fueron sellados con siliconas y colocados en la incubadora.
6. A los 5 días se examinó el desarrollo en los huevos, registrando el índice de crecimiento antes de retornarlos a la incubadora.
7. Se continúa con el desarrollo del polluelo hasta la salida del cascarón, en caso

de haberse registrado el índice de empollado y las condiciones de salud.

Resultados:

1. Se descartaron los huevos con ruptura de vitelo, restando 131 huevos del grupo experimental y 135 del control negativo.
2. Se controló el desarrollo al cabo de 5 días, resultando 7 de 131 (5%) huevos inyectados con indicios claros de desarrollo embrional.
3. De los 7 huevos con desarrollo embrional, 5 empollados produjeron polluelos normales y saludables.
4. Ninguno de los huevos de control negativo demostró signos de desarrollo.

Fuera de esta solicitud, se hace referencia a varias publicaciones. La revelación de esas publicaciones, así como las referencias aquí citadas, han sido incorporadas en su totalidad a esta solicitud a título de referencia, a fin de precisar en mayor detalle el nivel de la tecnología a la que pertenece esta invención.

Puede resultar obvio para los especialistas en este arte que pueden introducirse distintas modificaciones y variaciones a la presente invención, sin apartarse de la envergadura o del espíritu de la invención. Otras interpretaciones de la invención serán obvias para los especialistas en el tema, sin dejar de lado las especificaciones y la puesta en práctica de la invención aquí expuesta. Se desea transmitir la intención de que las especificaciones y ejemplos sólo se consideren como tales, siendo abarcada la real envergadura y espíritu de la invención en las reivindicaciones.

Exposición Nacional
- México -

48
49

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un polluelo a partir de un huevo puesto no fertilizado de ave en su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo recubierto por una membrana y un óvulo, que comprende la activación del óvulo y la incubación del huevo hasta la salida del cascarón.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el huevo de ave es de gallina.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el huevo de ave es de pavo.
4. El método de la reivindicación 1, en el que múltiples huevos son activados sustancialmente de modo simultáneo.
5. El método de la reivindicación 4, en el que al menos 20 huevos son activados.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la activación se efectúa induciendo partenogénesis en el huevo de ave.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la partenogénesis es inducida a través de la penetración de la membrana del vitelo.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la penetración se efectúa mediante una aguja.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la penetración se efectúa administrando al huevo una muestra de esperma que comprende esperma de ave en un vehículo fisiológicamente aceptable.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el huevo y el esperma se derivan de la misma especie.
11. El método de la reivindicación 9, en el que el vehículo es líquido seminal.
12. El método de la reivindicación 9, en el que el vehículo es líquido seminal diluido.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el líquido seminal diluido incluye Avidiluent.

14. El método de la reivindicación 10, en el que la muestra de esperma se administra en forma adyacente a una membrana que encierra el vitelo.
15. El método de la reivindicación 10, en el que la muestra de esperma se administra en forma adyacente a una membrana adyacente a un disco germinal.
16. El método de la reivindicación 10, en el que la muestra de esperma se administra debajo de la membrana.
17. El método de la reivindicación 10, en el que la membrana recibe un tratamiento, a fin de permitir al esperma la fertilización del huevo.
18. El método de la reivindicación 10, en el que la especie de ave es seleccionada del grupo que consiste en gallinas, codornices, patos, pavos, faisanes, avestruces, gansos y ñandúes.
19. El método de la reivindicación 18, en el que la especie avícola es la gallina.
20. El método de la reivindicación 10, en el que la muestra de esperma comprende una mezcla de esperma obtenido de más de un ave.
21. El método de la reivindicación 10, en el que la introducción de la muestra de esperma se efectúa practicando un orificio en la cáscara penetrando la misma e introduciendo la muestra de esperma en el huevo.
22. El método de la reivindicación 21, en el que la penetración y la introducción se efectúan mediante una aguja.
23. El método de la reivindicación 21, en el que el orificio es sellado.
24. El método de la reivindicación 23, en el que el orificio es sellado con un adhesivo.
25. El método de la reivindicación 10, en el que múltiples huevos son fertilizados sustancialmente de modo simultáneo.
26. El método de la reivindicación 25, en el que al menos 20 huevos son fertilizados.
27. El método de la reivindicación 25, en el que al menos 50 huevos son

fertilizados.

28. El método de la reivindicación 10, en el que el huevo es de gallina y la incubación del huevo requiere 21 a 23 días.

29. El método de la reivindicación 10, en el que la incubación se efectúa a una temperatura de aproximadamente 99,5 EF desde el día 1 hasta el día 18 de la incubación y una temperatura de aproximadamente 98,5 EF desde el día 19 de incubación hasta la salida del cascarón.

30. El método de la reivindicación 10, en el que la incubación se realiza con una humedad del 80% a partir del día 1 hasta la salida del cascarón.

31. El método de la reivindicación 10, que comprende además la vacunación del embrión durante la incubación.

32. Un método de fertilización un huevo puesto de ave dentro de su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo recubierto por una membrana, que comprende:

- a) la obtención de una muestra de esperma que incluye esperma avícola en un vehículo fisiológicamente aceptable; y
- b) la administración de la muestra de esperma al interior del huevo, a fin de fertilizar el mismo.

33. El método de la reivindicación 32, en el que el huevo y el esperma se derivan de miembros de la misma especie.

34. El método de la reivindicación 32, en el que el vehículo es líquido seminal.

35. El método de la reivindicación 32, en el que el vehículo es líquido seminal diluido.

36. El método de la reivindicación 35, en el que el líquido seminal comprende Avidiluent.

37. El método de la reivindicación 32, en el que la muestra de esperma es administrada en forma adyacente a una membrana que encierra el vitelo.

38. El método de la reivindicación 37, en el que la muestra de esperma es administrada en forma adyacente a un sector de la membrana que es adyacente al disco germinal.
39. El método de la reivindicación 32, en el que la muestra de esperma es administrada debajo de la membrana.
40. El método de la reivindicación 32, incluyendo además el tratamiento de la membrana a fin de aumentar la fertilización.
41. El método de la reivindicación 33, en el que la especie de ave es seleccionada del grupo que consiste en gallinas, codornices, patos, pavos, faisanes, avestruces, gansos y ñandúes.
42. El método de la reivindicación 41, en el que la especie avícola es la gallina.
43. El método de la reivindicación 32, en el que la muestra de esperma comprende una mezcla de esperma obtenido de más de un ave.
44. El método de la reivindicación 32, en el que la introducción de la muestra de esperma se efectúa practicando un orificio en la cáscara penetrando la misma e introduciendo la muestra de esperma en el huevo.
45. El método de la reivindicación 44, en el que la penetración y la introducción se efectúan mediante una aguja.
46. El método de la reivindicación 44, en el que el orificio es sellado.
47. El método de la reivindicación 46, en el que el orificio es sellado con un adhesivo.
48. El método de la reivindicación 32, en el que múltiples huevos son fertilizados sustancialmente de modo simultáneo.
49. El método de la reivindicación 48, en el que al menos 20 huevos son fertilizados.
50. El método de la reivindicación 48, en el que al menos 50 huevos son fertilizados.

51. Un método de fertilización de un huevo de gallina en la cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo recubierto por una membrana, que comprende:
- a) la obtención de una muestra de esperma incluyendo esperma de gallo en un vehículo fisiológicamente aceptable; y
 - b) la administración de la muestra de esperma al interior del huevo, a fin de fertilizar el mismo.
- ✓ 52. Un método de fertilización de un huevo de gallina en su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo recubierto por una membrana, que comprende:
- a) la obtención de esperma diluido de gallo; y
 - b) la administración del esperma diluido al interior del huevo, a fin de fertilizar el mismo.
53. Un método de fertilización de un huevo de gallina en su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo recubierto por una membrana, que comprende:
- a) la obtención de esperma diluido de gallo; y
 - b) la administración del esperma diluido al interior del huevo, a través de la penetración de la cáscara y la introducción del esperma diluido dentro del huevo.
54. Un método de fertilización de un huevo de gallina en la cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo recubierto por una membrana, que comprende:
- a) la obtención de esperma diluido de gallo; y
 - b) la administración del esperma diluido al interior del huevo en forma adyacente a una región de la membrana que es adyacente a un disco germinal, a través de la penetración de la cáscara y la introducción del esperma diluido dentro del huevo.
55. Un método de fertilización de un huevo puesto de gallina en su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo encerrado por una membrana, a efectos de empollar un polluelo, incluyendo la administración de una muestra de esperma de

gallo en un vehículo fisiológicamente aceptable al interior del huevo, a efectos de fertilizar el huevo e incubarlo hasta la salida del cascarón.

56. Un método de fertilización de un huevo puesto de gallina en su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo encerrado por una membrana, a fin de empollar un polluelo, incluyendo la administración de espermatozoides diluidos de gallo al interior del huevo, a efectos de fertilizar el huevo e incubarlo hasta la salida del cascarón.

57. Un método de fertilización de un huevo puesto de gallina en su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo encerrado por una membrana, a fin de empollar un polluelo, incluyendo la administración de espermatozoides diluidos de gallo al interior del huevo, mediante la penetración de la cáscara y la introducción de espermatozoides diluidos dentro del huevo a efectos de fertilizar el huevo e incubarlo hasta la salida del cascarón.

58. Un método de fertilización de un huevo puesto de gallina en su cáscara, en el que el huevo comprende un vitelo encerrado por una membrana, a fin de empollar un polluelo, incluyendo la administración de espermatozoides diluidos de gallo al interior del huevo, en forma adyacente a un sector de la membrana que es adyacente a un disco germinal, mediante la penetración de la cáscara y la introducción del espermatozoides diluido dentro del huevo, a efectos de fertilizar el huevo e incubarlo hasta la salida del cascarón.

✓ 59. Un huevo de ave puesto que comprende un embrión nativo con menos de 30.000 células, en el que el embrión puede convertirse en un polluelo.

60. El huevo de la reivindicación 59, en el que el embrión presenta menos de 20.000 células.

61. El huevo de la reivindicación 59, en el que el embrión presenta menos de 10.000 células.

62. El huevo de la reivindicación 59, en el que el embrión es un cigoto.

63. El huevo de la reivindicación 59, tratándose de un huevo de gallina.
64. Un huevo puesto de gallina que comprende un embrión nativo con menos de 30.000 células, en el que el embrión puede convertirse en un polluelo.
65. Un huevo de gallina puesto que comprende un cigoto nativo.
66. Un huevo de gallina puesto que comprende un embrión nativo con menos de 30.000 células, en el que el embrión puede convertirse en un polluelo y en el que la cáscara de huevo presenta un orificio menor a 4 centímetros.
67. El huevo de la reivindicación 66, en el que el embrión presenta menos de 20.000 células.
68. El huevo de la reivindicación 66, en el que el embrión presenta menos de 10.000 células.
69. El huevo de la reivindicación 66, en el que el embrión es un cigoto.
70. El huevo de la reivindicación 67, en el que el orificio está sellado.
71. El huevo de la reivindicación 67, en el que el orificio es menor a 1 centímetro.
72. El huevo de la reivindicación 67, en el que el orificio es menor a 5 milímetros.
73. Un huevo de ave puesto que comprende un embrión con menos de 30.000 células, en el que el embrión puede convertirse en un polluelo vivo y en el que la cáscara de huevo presenta un orificio menor a 4 centímetros.
74. Un huevo de ave puesto que comprende un embrión con menos de 20.000 células, en el que el embrión puede convertirse en un polluelo vivo y en el que la cáscara de huevo presenta un orificio menor a 1 centímetro.
75. Un huevo de ave puesto que comprende un cigoto, en el que el cigoto puede convertirse en un polluelo vivo y en el que la cáscara de huevo presenta un orificio menor a 4 centímetros.
76. Un huevo de ave puesto que comprende un cigoto, en el que el cigoto

puede convertirse en un polluelo vivo y en el que la cáscara de huevo presenta un orificio menor a 1 centímetro.

77. Un huevo producido por el método de la reivindicación 9, en el que el huevo incluye un cigoto.

78. Un huevo de ave puesto que comprende un vitelo nativo y un embrión que presenta menos de 30.000 células, en el que el embrión puede convertirse en un polluelo vivo.

79. Un huevo de ave puesto que comprende un vitelo nativo y un embrión que presenta menos de 20.000 células, en el que el embrión puede convertirse en un polluelo vivo.

80. Un huevo de ave puesto que comprende un vitelo nativo y un embrión que presenta menos de 10.000 células, en el que el embrión puede convertirse en un polluelo vivo.

81. Un método para producir un embrión de ave que contenga ácido nucleico heterólogo que incluya la introducción de ácido nucleico heterólogo dentro de un huevo de ave producido según el método de la reivindicación 1.

82. Un método para producir un embrión de ave que contenga ácido nucleico heterólogo que incluya la introducción de ácido nucleico heterólogo dentro de un huevo de ave producido según el método de la reivindicación 9.

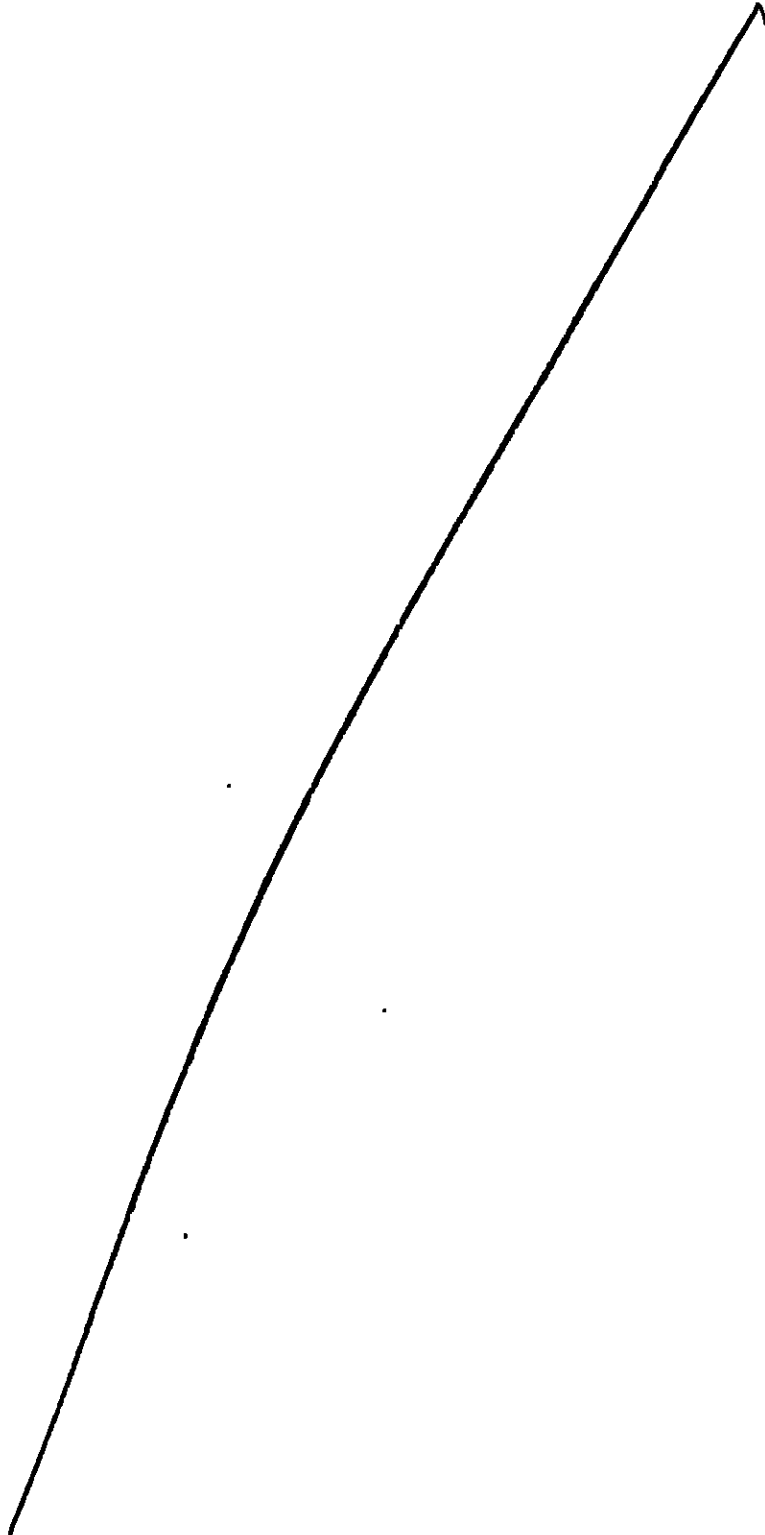
83. El método de la reivindicación 81, en el que el ácido nucleico heterólogo codifica una proteína farmacéutica, un antígeno, una hormona o un anticuerpo.

84. El método de la reivindicación 82, en el que el ácido nucleico heterólogo codifica una proteína farmacéutica, un antígeno, una hormona o un anticuerpo.

85. El método de la reivindicación 83, en el que el ácido nucleico heterólogo incluye el Avian Leukemia Virus derivado de partículas transducing.

86. El método de la reivindicación 83, en el que el ácido nucleico heterólogo codifica una proteína.

87. El método de la reivindicación 82, en el que el ácido nucleico heterólogo se encuentra integrado de modo estable en el genoma de ave.



Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un sector de reproducción avícola. En particular, la presente invención provee un método de activación de un huevo en su cáscara. La invención asimismo provee un método de activación de un huevo en su cáscara, en el que un polluelo vivo es empollado.

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA
SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
 Radicación: 01011964 00000000
 Fecha (A.D.): 6-20-64 13:30:00
 Trámite: 1 C-2 PUNTOS 0 1 ALBISTRO/ 411 PRESENTE/ 1
 Dependencia: C-20 D.V. 5/14 de L.F. de Comercio

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 9.435
FECHA : FEBRERO 15 DE 2001

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
TERESA ESPINOSA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	4099725	15/02/2001	1.232.080.00
TERESA ESPINOSA	RECIBO DE CAJA			4431	30/01/2001	68.000.00
TERESA ESPINOSA	RECIBO DE CAJA			68718	03/11/2000	167.000.00

***** C O N C E P T *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			336.640.00
		TOTAL :	\$ 336.640.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SEISCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
e-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D C ,Colombia



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 9.456
FECHA : FEBRERO 15 DE 2001

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 81011964 CCLJCCB3
Fecha (Lda): 02/02/2001 13:43:30
Trámite : 802 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVOS CRENCIGES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
TERESA ESPINOSA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	4099725	15/02/2001	1.232.080.00
TERESA ESPINOSA	RECIBO DE CAJA			4431	30/01/2001	68.000.00
TERESA ESPINOSA	RECIBO DE CAJA			68718	03/11/2000	167.000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100.000.00
		TOTAL :	100.000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
e-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D C, Colombia



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 9.457
FECHA : FEBRERO 15 DE 2001

INDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 01811964 C-7700028
Fecha (A.D.): 2001-02-15 15:43:53 Folios: 62
Tramite : C32 PATENTES D 1 RESISTIVO 411 PRESENTAC
Dependencia: 2028 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
TERESA ESPINOSA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	4099725	15/02/2001	1.232.000.00
TERESA ESPINOSA	RECIBO DE CAJA			4431	30/01/2001	68.000.00
TERESA ESPINOSA	RECIBO DE CAJA			68718	03/11/2000	167.000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100.000.00
	TOTAL :	\$ 100.000.00

SOM: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
e-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D C, Colombia

PATENTE DE INVENCION

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- Descripción de la invención
- Dibujos de ser estos pertinentes
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas

INCOMPLETA []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño .
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.

INCOMPLETA [1]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado.
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.
- Representación gráfica del esquema de trazado
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.

INCOMPLETA []

Fecha: Fecha Univ: 02/07/12 10:00:00
 Trámite : 000 PHICED 1 : 1 RESOLUCION 144 FISCALIA
 Dependencias: CON VIGILANCIA DE JUEVES (MARTIN)

Carrera 13 No. 27-80 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia



63

64

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020
Bogotá, D.C.

Doctora
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

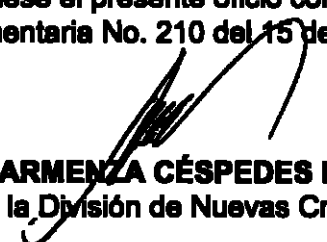
REFERENCIA:	Radicación No.	01-11964
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1075
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.
- Debe indicarse el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art. 27-c, D 486/00).
- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 28-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 19 ABR. 2001.

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de éste plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: info@slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia