

REIVINDICACIONES

1. Un método caracterizado porque comprende las etapas de:

obtener embriones de ungulados producidos *in vitro* (IVP)

criopreservar los embriones; y

transferir embriones para implantación en ungulados receptores, realizando la crioconservación y la transferencia para lograr tasas de preñez de al menos aproximadamente el 10%.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de obtención de embriones producidos *in vitro* comprende las etapas de:

recuperar los oocitos de las hembras;

madurar los oocitos *in vitro*;

fertilizar los oocitos maduros con semen de modo de generar cigotos; y

desnudar y cultivar los cigotos.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el semen se separa por sexo.

4. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el semen no se separa por sexo.

5. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la etapa de maduración de los oocitos *in vitro* comprende:

incubar los oocitos dentro de un intervalo fisiológicamente relevante para al menos una condición seleccionada del grupo que consiste en: temperatura, presencia o cantidad de gas, humedad, pH, osmolaridad y

combinaciones de ellos.

6. El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque la presencia o la cantidad de un gas se selecciona del grupo que consiste en O_2 y CO_2 .

7. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la etapa de maduración de los oocitos *in vitro* comprende: incubar los oocitos a 35-40 °C con 3-9 % de CO_2 y humedad saturada.

8. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la etapa de desnudar y cultivar cigotos comprende incubar los cigotos a 35-40 °C con 5% de CO_2 en aire y humedad saturada.

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque la etapa de desnudar y cultivar cigotos también comprende incubar los cigotos al 5% de O_2 .

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de crioconservación de embriones comprende las etapas de:

incubar los embriones en una solución que comprende un crioprotector; y

sumergir los embriones en nitrógeno líquido.

11. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de crioconservación del embrión comprende las etapas de:

incubar embriones en solución de congelación que consiste en 1,0 - 4 M de etilenglicol durante 5 - 30 minutos a una primera temperatura dentro de un intervalo de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 38 °C;

cargar los embriones en un receptáculo, donde las burbujas de aire separan los embriones de una solución de

descongelación que comprende etilenglicol en un medio diluyente isotónico;

exponer los embriones a una temperatura dentro de un intervalo de aproximadamente -2 a aproximadamente -10 °C durante un período de tiempo dentro de un intervalo de aproximadamente 1 min a aproximadamente 60 minutos;

reducir la temperatura a una tasa dentro de un intervalo de aproximadamente -0,2 a aproximadamente - 0,8 °C por minuto hasta alcanzar una segunda temperatura dentro de un intervalo de aproximadamente -30 a aproximadamente -36 °C; y

sumergir los embriones en nitrógeno líquido para almacenamiento.

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque el etilenglicol está presente en una concentración final dentro de un intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1,3 M.

13. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque los embriones se criopreservan para transferencia directa a hembras receptoras.

14. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la transferencia de los embriones comprende las etapas de:

cultivar los embriones en un medio suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) bajo aceite mineral durante un período de tiempo dentro de un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 días; y

transferir los embriones a ungulados receptores.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el medio se selecciona del grupo que

consiste en medio C4, medio SOf, medio SOFaa y combinaciones de ellos.

16. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque los embriones están en una etapa de desarrollo seleccionada del grupo que consiste en mórula, blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido.

17. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque los ungulados receptores están sincronizados.

18. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque los ungulados receptores están en estro natural.

19. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque los embriones son frescos, vitrificados o congelados.

20. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque los ungulados son vacas

21. El método de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque los embriones se seleccionan de especies de ganado vacuno que comprende *Bos Taurus*, *Bos indicus* y *Bos indicus-taurus* de raza cruzada.

22. Un embrión crioconservado caracterizado porque es producido por un método, que comprende las etapas de:

obtención de embriones de ungulados producidos *in vitro* (IVP);

crioconservación de los embriones en condiciones que, cuando los embriones crioconservados se transfieren a ungulados receptores, se logran tasas de preñez de al menos aproximadamente el 10%.

23. El embrión de conformidad con la reivindicación 22,

caracterizado porque la obtención de embriones producidos *in vitro* comprende las etapas de:

recuperar los oocitos de las hembras;
madurar los oocitos *in vitro*;
fertilizar los oocitos maduros con semen; y
desnudar y cultivar cigotos.

24. El embrión de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la maduración de los oocitos *in vitro* comprende incubar los oocitos dentro de un intervalo fisiológicamente relevante para al menos una condición seleccionada del grupo que consiste en: temperatura, presencia o cantidad de gas, humedad, pH, osmolaridad y combinaciones de ellos.

25. El embrión de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque la transferencia de embriones comprende las etapas de:

cultivar embriones en un medio suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) bajo aceite mineral durante un período de tiempo dentro de un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 días; y
transferir los embriones a ungulados receptores.

26. El embrión de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el medio se selecciona del grupo que consiste en medio C4, medio SOF, medio SOFaa y combinaciones de ellos.

27. El embrión de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque está en una etapa de desarrollo seleccionada del grupo que consiste en mórula, blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido.

28. Un dispositivo caracterizado porque comprende:

un receptáculo;

un embrión crioconservado en solución de crioconservación ubicado dentro de una primera región del receptáculo, cuya primera región está flanqueada por:

segunda y tercera región, cada una de las cuales contiene aire, cuya segunda y tercera región están flanqueadas por:

cuarta y quinta región, cada una de las cuales contiene soluciones de descongelación, cuya cuarta y quinta región están flanqueadas por:

sexta y séptima región, cada una de las cuales contiene aire, cuya sexta y séptima región están flanqueadas por:

octava y novena región, cada una de las cuales contiene soluciones de descongelación.

29. El dispositivo de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque una o varias de las regiones es una cámara en la que la cámara se define por una entidad de partición física que proporciona una barrera entre ella y al menos otra región con la que es adyacente.

30. Una pluralidad de los dispositivos de conformidad con la reivindicación 28.

31. Un método caracterizado porque comprende las etapas de:

crioconservación de una pluralidad de embriones de ungulados; y

transferencia de la pluralidad embriones a ungulados receptores, donde la crioconservación y la transferencia se llevan a cabo de modo tal de lograr una tasa de concepción de al menos el 30%.

32. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la etapa de crioconservación ubica cada embrión en solución de crioconservación dentro de una primera región de un receptáculo, cuya primera región está flanqueada por:

segunda y tercera región, cada una de las cuales contiene aire, cuya segunda y tercera región están flanqueadas por:

cuarta y quinta región, cada una de las cuales contiene soluciones de descongelación, cuya cuarta y quinta región están flanqueadas por:

sexta y séptima región, cada una de las cuales contiene aire, cuya sexta y séptima región están flanqueadas por:

octava y novena región, cada una de las cuales contiene solución de descongelación.

33. Un método de congelamiento de embriones, caracterizado porque comprende:

exponer los embriones de ungulados a una solución de congelación (SC), que consiste en 1,0 - 4 M de etilenglicol durante 10 minutos a 35 °C;

ubicar cada embrión en una solución de congelación (SC), dentro de un receptáculo dimensionado como una pajuela, de modo que el embrión en solución de congelación, rodeado por cuatro columnas de solución de descongelación (SD), está intercalado por columnas de aire entre ellas, donde la solución de descongelación comprende 0,75 M de etilenglicol;

exponer el receptáculo a condiciones de temperatura estabilizadas a una temperatura dentro de un intervalo de

aproximadamente 0 °C a aproximadamente -10 °C;

cristalizar las columnas por sobre y por debajo del embrión dos minutos después de colocarlo en la congeladora;

mantener el embrión durante 1 a 60 minutos a una temperatura dentro de un intervalo de aproximadamente 0 °C a aproximadamente -10 °C;

reducir la temperatura a una tasa dentro de un intervalo de aproximadamente -0,2 a aproximadamente - 0,8 °C por minuto hasta alcanzar una segunda temperatura dentro de un intervalo de aproximadamente -30 a aproximadamente - 36 °C; y

sumergir los embriones congelados en nitrógeno líquido.

34. Un método de descongelación de embriones, caracterizado porque comprende:

exponer un receptáculo que contiene un embrión crioconservado en solución de crioconservación ubicado dentro de una primera región del receptáculo, cuya primera región está flanqueada por:

segunda y tercera región, cada una de las cuales contiene aire, cuya segunda y tercera región están flanqueadas por:

cuarta y quinta región, cada una de las cuales contiene soluciones de descongelación, cuya cuarta y quinta región están flanqueadas por:

sexta y séptima región, cada una de las cuales contiene aire, cuya sexta y séptima región están flanqueadas por:

octava y novena región, cada una de las cuales contiene soluciones de descongelación en aire de

temperatura ambiente durante un primer período de tiempo, cuyo primer período de tiempo es suficiente para comenzar a descongelar los embriones congelados;

exponer el receptáculo a un ambiente de descongelación caracterizado por una temperatura de descongelación dentro de un intervalo de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 38 °C durante un segundo período de tiempo, cuyo segundo período de tiempo es suficiente para descongelar la solución de congelación; y

mezclar la solución de descongelación, solución de congelación y embrión dentro del receptáculo.

35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el primer período de tiempo está dentro de un intervalo de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 38 °C.

36. El método de conformidad con la reivindicación 34 o 35, caracterizado porque el segundo período de tiempo está dentro de un intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 38 °C.

37. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el ambiente de descongelación es o comprende un baño líquido.

38. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque la temperatura de descongelación está dentro de un intervalo de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 38 °C.

39. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque la etapa de mezcla se logra por medio de agitación moderada del receptáculo.

40. El método de conformidad con la reivindicación 34,

caracterizado porque también incluye una etapa de transferencia del embrión a un ungulado receptor.

41. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque la transferencia se lleva a cabo de modo simultáneo o después de la etapa de exposición o la etapa de mezcla.

42. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque la etapa de transferencia comprende transferir el cuerno uterino del ungulado receptor.