

CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES DE UNGULADOS

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La producción de embriones *in vitro* es un componente principal de la cría selectiva de ganado. A menudo, se producen más embriones que los que se implantan. Si bien se ha logrado recientemente más del 30% de las tasas de concepción en la transferencia de embriones (ET) de embriones vitrificados producidos *in vitro* (IVP), el complejo proceso de la recuperación de estos embriones después de la vitrificación sigue siendo un obstáculo para el uso comercial de esta técnica. Existe la necesidad de protocolos nuevos y eficientes para la crioconservación de embriones bovinos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona tecnologías para la crioconservación de embriones bovinos y/o para lograr la fertilización con embriones bovinos crioconservados. La presente invención también proporciona embriones crioconservados, poblaciones de tales embriones crioconservados, sistemas para generarlos y/o almacenarlos, etc.

Entre otras cosas, la presente invención comprende la identificación de una fuente de un problema con determinadas tecnologías disponibles para transferencia embrionaria de embriones crioconservados, en particular con procesos para

recuperar (por ejemplo, descongelar, implantar, etc.)
embriones crioconservados. Por ejemplo, la presente
descripción aprecia que el personal y el tiempo requeridos para
recuperar embriones crioconservados viables de acuerdo con
5 muchas tecnologías estándar plantean problemas con respecto a
su aplicabilidad comercial.

Por otra parte, la presente descripción también aprecia
que hay una necesidad de tecnologías de transferencia de
embriones crioconservados que logran tasas de concepción
10 mejoradas respecto de las tecnologías más estándar que utilizan
embriones crioconservados, entendiendo que tales tecnologías
estándar normalmente logran tasas de concepción que están muy
por debajo de aquellas logradas con embriones frescos. Entre
otras cosas, la presente descripción proporciona tecnologías
15 que logran tasas de concepción deseables (por ejemplo, de
aproximadamente el 10% o más) para embriones crioconservados.

En algunas modalidades, la invención proporciona métodos
que comprenden etapas de, por ejemplo: obtención *in vitro* de
embriones producidos (IVP) de ungulados; crioconservación de
20 los embriones; y transferencia de embriones para implantación
en ungulados receptores, realizando la crioconservación y la
transferencia para obtener tasas de preñez de al menos
aproximadamente el 10%.

En algunas modalidades, la obtención de uno o varios
25 embriones producidos *in vitro* comprende las etapas de, por

ejemplo: recuperar uno o varios oocitos de hembras; madurar uno o varios oocitos *in vitro*; fertilizar uno o varios oocitos maduros con semen o una o varias células aisladas de esperma para generar uno o varios cigotos; y desnudar y cultivar uno o
5 varios cigotos. En algunas modalidades, el semen utilizado se separan por sexo. En algunas modalidades, el semen no se separa por sexo.

En algunas modalidades, la maduración de los oocitos *in vitro* comprende, por ejemplo: incubar oocitos dentro de un
10 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. En algunas modalidades, la presencia o cantidad de un gas se selecciona del grupo que consiste en O₂
15 y CO₂. En algunas modalidades, la etapa de maduración de oocitos *in vitro* comprende: incubar oocitos a 35-40 °C con 3-9 % de CO₂ y humedad saturada. En algunas modalidades, la etapa de desnudar y cultivar cigotos comprende incubar los cigotos a 35-40 °C con 5% de CO₂ en aire y humedad saturada. En algunas
20 modalidades, la etapa de desnudar y cultivar cigotos también comprende incubar los cigotos al 5% de O₂.

En algunas modalidades, la crioconservación de embriones comprende las etapas de, por ejemplo: incubar embriones en una solución que comprende crioprotector; y sumergir los embriones
25 en nitrógeno líquido. En algunas modalidades, 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 5 aproximadamente 38 °C; carga de los embriones en un receptáculo, donde burbujas de aire separan los embriones de una solución de descongelación que comprende etilenglicol en un medio diluyente isotónico; exposición de los embriones a una temperatura dentro de un intervalo de aproximadamente -2 a 10 aproximadamente -10 °C durante un período de tiempo dentro de un intervalo de aproximadamente 1 min a aproximadamente 60 minutos; reducción de 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 15 intervalo de aproximadamente -30 a aproximadamente -36 °C; e inmersión de los embriones en nitrógeno líquido para almacenamiento. En algunas modalidades, el etilenglicol está presente en una concentración final dentro de un intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1,3 M.

20 En algunas modalidades, los embriones se criopreservan para transferencia directa a hembras receptoras.

En algunas modalidades, la transferencia de embriones comprende las etapas de: cultivar embriones en un medio suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) bajo aceite 25 mineral durante un período de tiempo dentro de un intervalo de

aproximadamente 5 a aproximadamente 9 días; y transferir los embriones a ungulados receptores. En algunas modalidades, el medio se selecciona del grupo que consiste en medio C4, medio SOF, medio SOFaa y combinaciones de ellos. En algunas
5 modalidades, el medio está suplementado con uno o varios de suero, suero bovino fetal, suero de ternero fetal, albúmina de suero bovino y/o uno o varios aminoácidos.

En algunas modalidades, los embriones transferidos están en una etapa de desarrollo seleccionada del grupo que consiste
10 en mórula, blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido.

En algunas modalidades, los ungulados receptores están sincronizados. En algunas modalidades, los ungulados receptores están en estro natural. En algunas modalidades, los
15 embriones son frescos, vitrificados o congelados. En algunas modalidades, los ungulados son vacas. En algunas modalidades, los embriones de una especie se seleccionan de *Bos Taurus*, *Bos indicus* y *Bos indicus-taurus* de raza cruzada.

En algunas modalidades, la invención proporciona un
20 embrión crioconservado producido por un método que comprende las etapas de, por ejemplo: obtener embriones de ungulados producidos *in vitro* (IVP); crioconservación de los embriones en condiciones tales que, cuando los embriones crioconservados se transfieren a ungulados receptores, se logran tasas de
25 preñez de al menos aproximadamente el 10%. En algunas

modalidades, la obtención de embriones producidos *in vitro* comprende las etapas de, por ejemplo: recuperar oocitos de hembras; madurar los oocitos *in vitro*; fertilizar los oocitos maduros con semen; y desnudar y cultivar los cigotos. En
5 algunas modalidades, la maduración de los oocitos *in vitro* comprende incubar 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
10 ellos. En algunas modalidades, 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
15 embriones en ungulados receptores.

En algunas modalidades, los medios utilizados de acuerdo con la presente invención es o comprende un medio seleccionado del grupo que consiste en medio C4, medio SOF, medio SOFaa y combinaciones de ellos. En algunas modalidades, el medio está
20 suplementado con uno o varios de suero, suero bovino fetal, suero de ternero fetal, albúmina de suero bovino y/o uno o varios aminoácidos.

En algunas modalidades, los embriones crioconservados y/o transferidos de acuerdo con la presente descripción están
25 en una etapa de desarrollo seleccionada del grupo que consiste

en mórula, blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido.

En algunas modalidades, la invención proporciona un dispositivo que comprende: un receptáculo; un embrión
5 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
10 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
15 flanqueadas por: octava y novena región, cada una de las cuales contiene soluciones de descongelación. En algunas modalidades, una o varias de las regiones es una cámara en donde 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. En algunas modalidades, la invención proporciona una pluralidad de los dispositivos.

20 En algunas modalidades, la invención proporciona métodos que comprenden las etapas de: criopreservar una pluralidad de embriones de ungulados; y transferir la pluralidad de embriones a ungulados receptores, donde la criopreservación y la transferencia se llevan a cabo de modo de lograr una tasa de
25 concepción de al menos el 30%. En algunas modalidades, la etapa

de crioconservación para ubicación de 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
5 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
10 y novena región, cada una de las cuales contiene solución de descongelación.

En algunas modalidades, la invención proporciona métodos de congelación de embriones, por ejemplo, que comprenden: exponer embriones de ungulados a la solución de congelación
15 (SC), que consiste en aproximadamente 1 a aproximadamente 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
20 de solución de descongelación (SD), está intercalado por columnas de aire entre ellas, donde la solución de descongelación comprende aproximadamente 0,75 M de etilenglicol; exponer el receptáculo a condiciones de temperatura estabilizadas a una temperatura dentro de un
25 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; 5 reducir la temperatura a una tasa dentro de un intervalo de aproximadamente -0,2 °C a aproximadamente - 0,8 °C por minuto hasta alcanzar una segunda temperatura dentro de un intervalo de aproximadamente -30 °C a aproximadamente -36 °C; y sumergir los embriones congelados en nitrógeno líquido. En algunas 10 modalidades, el receptáculo, que contiene el embrión congelado, se sumerge en nitrógeno líquido después de alcanzar la segunda temperatura dentro de un intervalo de aproximadamente -30 °C a aproximadamente -36 °C.

En algunas modalidades, la invención proporciona métodos 15 de descongelación de embriones, por ejemplo, que comprenden: 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 20 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 25 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. En algunas modalidades, el primer período de tiempo está dentro de un intervalo de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 38 °C. En algunas modalidades, el segundo período de tiempo está dentro de un intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 38 °C. En algunas modalidades, el ambiente de descongelación es o comprende un baño líquido. En algunas modalidades, la temperatura de descongelación está dentro de un intervalo de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 38 °C. En algunas modalidades, la etapa de mezcla se logra por medio de agitación moderada del receptáculo. En algunas modalidades, el método de descongelación también incluye una etapa de transferencia del embrión a un ungulado receptor. En algunas modalidades, la transferencia se lleva a cabo de modo simultáneo o después de la etapa de exposición o la etapa de mezcla. En algunas

modalidades, la etapa de transferencia comprende transferir el embrión al cuerno uterino del ungulado receptor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa un esquema de carga para usar
5 embriones congelados en la transferencia directa de embriones. Como se representa en esta figura, los embriones en solución de congelación pueden disponerse en dispositivos (por ejemplo, un embrión por dispositivo) en los que las regiones de solución están separadas por regiones de aire. Por ejemplo, como se
10 representa en la Figura 1, un embrión 100 en la solución de congelación 200 está localizado dentro de una primera región 300 (gris en la Figura 1) de un dispositivo de columna 400 (por ejemplo, una pajuela). Inmediatamente flanqueando esa primera región, hay dos regiones (las regiones segunda 305 y tercera
15 315, cada una de las cuales está punteada en la Figura 1) que contienen aire, y luego dos regiones (las regiones cuarta 310 y quinta 320, cada una de las cuales está rayada en la Figura 1) que contiene solución de descongelación, seguida por dos regiones más (las regiones sexta 325 y séptima 335, cada una
20 de las cuales está punteada en la Figura 1) que también contienen aire, seguidas por dos regiones más (las regiones octava 330 y novena 340, cada una de las cuales está rayada en la Figura 1) que también contiene solución de descongelación. El dispositivo particular representado en la Figura 1 es una
25 pajuela de 0,25 ml colocada en una columna central; la solución

de congelación es etilenglicol 1,5 M; y la solución de descongelación es una dilución 1:1 de la solución de congelación en DPBS, de modo que es etilenglicol 0,75 M en una solución salina amortiguada con fosfato de Dubelcco (DPBS).

5 Las Figuras 2A y 2B (juntas comprenden la Figura 2) representan vistas generales de los esquemas de congelación (Figura 2A) y de descongelación (Figura 2B) como se describe a grandes rasgos en la Ejemplificación de la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 **Definiciones**

Para que la presente invención se entienda más fácilmente, se definen a continuación determinados términos. Las personas capacitadas en la técnica comprenderán que las definiciones para determinados términos pueden proporcionarse en cualquier otra parte de la descripción, y/o serán claras a partir del contexto.

Aproximadamente: como se usa en la presente, el término "aproximadamente", tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En determinadas modalidades, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores que entra dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12 %, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia enunciado, a menos que se indique lo contrario o

sea evidente de otro modo en el contexto (excepto cuando el número exceda el 100% de un posible valor).

Inseminación artificial (AI, Artificial Insemination): como se usa en la presente, la expresión "inseminación artificial" se refiere a la introducción por la mano del hombre de semen en el útero de un bovino hembra para lograr la preñez. En muchas modalidades, la AI se utiliza en la reproducción, por ejemplo, de modo que las preñeces resultantes son (o están destinadas a ser) llevadas a término. En algunas modalidades, la AI se lleva a cabo con semen recolectado. En algunas modalidades, la AI se lleva a cabo con semen extraído. En algunas modalidades, la AI se lleva a cabo con semen que ha sido procesado; por ejemplo, en algunas modalidades, el semen ha sido sexado de modo que se enriquece para esperma de solamente un sexo. Las personas capacitadas en la técnica comprenderán esto. A menos que se indique expresamente lo contrario, el término "AI" no incluye procedimientos de transferencia de embriones, en los que, por ejemplo, se puede introducir semen en una vaca para generar embriones para transferencia.

Blastocisto: como se usa en la presente, el término "blastocisto" se refiere a una estructura formada en el desarrollo temprano de los mamíferos. Posee una masa celular interna (ICM) que posteriormente forma el embrión. El trofoblasto es la capa externa de células del blastocisto. Esta

capa rodea una masa celular interna (que es una fuente de células madre embrionarias) y una cavidad llena de líquido conocida como blastocele. El trofoblasto da lugar a la placenta. El uso de blastocistos para la fertilización *in vitro* (IVF) implica cultivar un óvulo fertilizado antes de implantarlo en un útero bovino.

Raza: como se usa en la presente, el término "raza" se refiere a un grupo de ungulados (por ejemplo, ganado vacuno) que tienen ancestros comunes y/o comparten determinados rasgos distinguibles que no son ungulados compartidos de otras razas. Las personas capacitadas en la técnica están familiarizadas con los estándares y/o características de las razas. En muchas modalidades, se produce y/o se mantiene una raza particular apareando entre sí un progenitor o progenitores identificados (por ejemplo, un semental en particular con una hembra reproductora en particular o con cualquier hembra reproductora de una línea de hembras reproductoras en particular) entre sí.

Comparable: el término "comparable" se usa en la presente para describir dos (o más) conjuntos de condiciones, circunstancias, individuos o poblaciones que son suficientemente similares entre sí para permitir la comparación de los resultados obtenidos o de los fenómenos observados. En algunas modalidades, los conjuntos comparables de condiciones, circunstancias, individuos o poblaciones se caracterizan por una pluralidad de características sustancialmente idénticas y

por una característica o una pequeña cantidad de características variadas. Las personas capacitadas en la técnica comprenderán que los conjuntos de circunstancias, individuos o poblaciones son comparables entre sí cuando se

5 caracterizan por un número y tipo suficientes de características sustancialmente idénticas para garantizar una conclusión razonable de que las diferencias en los resultados obtenidos o en los fenómenos observados con diferentes conjuntos de circunstancias, individuos o poblaciones son

10 causados o son indicativos de la variación en esas características que han variado. Las personas capacitadas en la técnica apreciarán que el lenguaje relativo utilizado en la presente (por ejemplo, mejorado, activado, reducido, inhibido, etc.) se referirá normalmente a comparaciones realizadas en

15 condiciones comparables.

Raza cruzada: como se usa en la presente, la expresión "raza cruzada" se refiere a ungulados (por ejemplo, ganado vacuno) producidos a partir de gametos de animales individuales que son de diferentes razas o variedades de ungulados (por

20 ejemplo, ganado vacuno). El cruzamiento se realiza a menudo en la ganadería de vacas lecheras para producir ganado más saludable y más productivo en comparación con las razas progenitoras. El cruzamiento es el apareamiento deliberado de animales de diferentes razas o cepas; en muchas modalidades,

25 el cruzamiento se diseña para aprovechar la heterosis (vigor

híbrido) para características tales como la producción, fertilidad y longevidad. En algunas modalidades, la presente descripción comprende el conocimiento de que los desarrollos recientes relacionados con la inseminación artificial y/o con la fertilización *in vitro*, no normalmente empleados en la industria del ganado lechero, pueden utilizarse para permitir y/o proporcionar determinadas ventajas con respecto a la generación y/o preservación de líneas cruzadas de ganado lechero como se describe en la presente. Como se describe en la presente, los ungulados cruzados de particular interés son híbridos, en los que el 50% de los cromosomas somáticos del animal son de una cepa o línea y el 50% son de una cepa o línea diferente (es decir, formados cruzando individuos F0 de la primera y segunda cepa/línea que difieren entre sí. Sin embargo, las personas capacitadas en la técnica comprenderán que el término "cruzamiento" se puede usar en algunas modalidades (como es evidente en el contexto) para referirse a cualquier individuo cuyo genoma, como resultado del cruzamiento, no sea el 100% de ninguna raza individual. *Célula diploide*: como se usa en la presente, la expresión "célula diploide" se refiere a una célula con un par homólogo de cada uno de sus cromosomas autosómicos, con dos copias ($2n$) de cada locus genético autosómico.

Etapas de desarrollo: como se usa en la presente, la expresión "etapas de desarrollo" se refiere a las etapas de

desarrollo embrionario. En algunas modalidades, las etapas de desarrollo incluyen: la mórula, el blastocisto temprano, el blastocisto y el blastocisto expandido.

Transferencia directa: como se usa en la presente, la expresión "transferencia directa" se refiere a un método para criopreservar lentamente un embrión. Los embriones se incuban en una solución de congelación que comprende crioprotectores, tales como etilenglicol o glicerol, y se exponen a temperaturas gradualmente decrecientes hasta que el embrión se congela y posteriormente se sumerge en nitrógeno líquido. En algunas modalidades, el embrión dentro de la solución de congelación se carga en una pajuela que es expuesta a temperaturas de congelación. El método de transferencia directa de crioconservación también se conoce como "congelación lenta".

Embrión: como se usa en la presente, el término "embrión" se refiere a un oocito fertilizado (huevo) preparado para implantación inmediata dentro de un ungulado hembra o almacenado para eventual implantación dentro de un ungulado hembra.

Transferencia fresca: como se usa en la presente, la expresión "transferencia fresca" se usa para referirse a un método de implantar embriones en ungulados receptores (por ejemplo, ganado vacuno) después de la fertilización, evitando la crioconservación. En algunas modalidades, los embriones se cultivan *in vitro* durante días antes de su implantación en una

hembra receptora.

Gametos: como se usa en la presente, el término "gametos" se usa para referirse a células reproductivas (por ejemplo, espermatozoides u oocitos) que tienen el número haploide de cromosomas, especialmente espermatozoides maduros o un huevo capaz de fusionarse con un gameto del sexo opuesto de manera de producir un huevo fertilizado. Los gametos se producen por intermedio del proceso de la meiosis.

Semen separado por sexo: tal como se usa en la presente, la expresión "semen separado por sexo" se refiere al semen que se ha manipulado para seleccionar espermatozoides de solamente un sexo preferido. En algunas modalidades, el semen separado por sexo también se conoce como "semen sexado". En algunas modalidades, el semen separado por sexo es "semen enriquecido por sexo", término éste que se refiere al semen que ha sido manipulado para enriquecerse en espermatozoides de un solo sexo preferido. En algunas modalidades, el semen enriquecido en sexo comprende al menos aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, o

aproximadamente el 99% de espermatoцитos de sólo un sexo preferido.

Perfil genómico: como se usa en la presente, la expresión "perfil genómico" se refiere a un subconjunto representativo
5 de la información total contenida dentro de un genoma. Normalmente, un perfil genómico contiene genotipos en un conjunto particular de loci polimórficos. En algunas modalidades, un perfil genómico puede correlacionarse con una de sus características, rasgos o conjuntos particulares
10 característicos, por ejemplo, de un animal, línea, raza o población cruzada en particular.

Genotipo: como se usa en la presente, el término "genotipo" se refiere a la combinación diploide de alelos en un locus genético determinado, o conjunto de loci relacionados,
15 en una célula u organismo dados. Un sujeto homocigoto porta dos copias del mismo alelo y un sujeto heterocigoto porta dos alelos distintos. En el caso más simple de un locus con dos alelos "A" y "a", se pueden formar tres genotipos: A/A, A/a y a/a.

20 *Genotipado:* como se usa en la presente, el término "genotipado" se refiere a un protocolo experimental, computacional o de observación para distinguir el genotipo de un individuo en uno o más loci bien definidos. Las personas capacitadas en la técnica conocerán una variedad de tecnologías
25 que pueden realizar de manera útil y efectiva el genotipado.

En algunas modalidades, el genotipado implica la detección directa de un ácido nucleico o de una secuencia de ácidos nucleicos. En algunas modalidades, el genotipado implica la detección indirecta de un ácido nucleico o de una secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo, por intermedio de la detección o análisis de un marcador proxi o evento que se correlaciona con la presencia del ácido nucleico o de la secuencia de ácidos nucleicos.

Célula haploide: como se usa en la presente memoria, la expresión "célula haploide" se refiere a una célula con un único cromosoma ($1n$) de cromosomas - la mitad del número de una célula somática.

Tenera: como se usa en la presente, el término "ternera" se refiere a ganado vacuno hembra que aún no ha producido ningún ternero.

Híbrido: como se usa en la presente, el término "híbrido" se refiere a ungulados (por ejemplo, ganado vacuno) producidos como resultado de cruzar gametos macho y hembra de diferentes razas o líneas de ungulados. Por lo tanto, normalmente, el 50% del genoma autosómico (por ejemplo, el genoma somático) de un híbrido es de una primera raza/línea, y el 50% es de una segunda raza/línea. De particular interés, como se describe en la presente, son los híbridos en los que el 50% de sus cromosomas somáticos son de una primera raza y el 50% son de una segunda raza.

Fertilización in vitro (IVF): como se usa en la presente, la expresión "fertilización *in vitro*" se refiere a un método para fertilizar un huevo fuera de un animal vivo. La IVF es un proceso por el cual un óvulo es fertilizado por esperma fuera del cuerpo (es decir, *in vitro*, que literalmente se traduce como "en vidrio" pero entendiéndose en la técnica que se refiere a la técnica para referirse a procesos realizados, por ejemplo, en un laboratorio o entorno artificial). En algunas modalidades, un proceso de IVF puede implicar monitorizar y/o

5 estimular el proceso ovulatorio de una hembra, extraer un oocito u oocitos (óvulos o huevos) de los ovarios de una hembra y/o poner en contacto esperma y oocitos entre sí en un laboratorio (por ejemplo, en un medio fluido) para lograr la fertilización. En algunas modalidades, la IVF implica cultivar

10 un huevo fertilizado (cigoto) en un medio de crecimiento y/o implantarlo en el útero de una hembra o almacenarlo para su análisis y/o implantación futura. En algunas modalidades, la IVF puede implicar clasificar huevos fertilizados en función de atributos deseados particulares (por ejemplo, sexo).

20 *Línea*: como se usa en la presente, el término "línea" se refiere a una cepa de ganado vacuno que descende de progenitores ancestrales comunes desarrollada y mantenida mediante reproducción selectiva.

Apareamiento: el término "apareamiento", como se usa en

25 la presente, se refiere a un proceso que da como resultado la

formación de un embrión, normalmente de dos gametos de sexo opuesto. En algunas modalidades, el apareamiento implica un servicio natural. En algunas modalidades, el apareamiento implica la inseminación artificial. En algunas modalidades, el
5 apareamiento implica IVF. En muchas modalidades descritas en la presente, el apareamiento se utiliza para generar progenie híbrida. En muchas modalidades, el apareamiento se utiliza para generar progenie de cruce.

Mórula: como se usa en la presente, el término "mórula"
10 se refiere a una etapa de desarrollo embrionario. La mórula, una etapa temprana del embrión que consiste en una bola de células (llamadas blastómeros) contenidas dentro de la zona pelúcida, se produce a partir del cigoto unicelular mediante una serie de hendiduras. A través de la diferenciación celular
15 y la cavitación, la mórula da lugar al blastocisto. Una vez que una cavidad llena de líquido comienza a abrirse en la mórula, comienza la etapa de blastocisto del desarrollo embrionario. Durante la formación del blastocisto, las células de la mórula se diferencian en una masa celular interna que
20 crece en el interior del blastocelo y las células trofoblásticas que crecen en el exterior.

Servicio natural: como se usa en la presente, la expresión "servicio natural" se refiere a la cría de ganado vacuno tradicional de aparear machos y hembras sin inseminación
25 artificial ni técnicas a base de IVF.

Receptáculo: como se usa en la presente, el término "receptáculo" se refiere a un dispositivo para contener uno o más embriones crioconservados. El receptáculo puede contener una serie de regiones o cámaras para contener: aire, solución
5 de descongelación o embrión en solución de crioconservación. En algunas modalidades, el receptáculo es o comprende una pajuela.

Sustancialmente: como se usa en la presente, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de
10 presentar una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Una persona capacitada en biología comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez o nunca llegan a completarse ni logran un resultado absoluto, o lo evitan. Por lo tanto, el término
15 "sustancialmente" se usa en la presente para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

Rasgo: como se usa en la presente, el término "rasgo" se refiere a un atributo detectable de un individuo. Normalmente,
20 la expresión de un rasgo particular puede estar total o parcialmente influenciada por la constitución genética de un individuo. En algunas modalidades, un rasgo es característico de un individuo, línea, raza o cruce en particular, por ejemplo, en el que se puede confiar (individualmente o como
25 parte de un conjunto) para distinguir ese individuo, línea,

raza o cruza de otros.

Ungulado: como se usa en la presente, el término "ungulado" se refiere a un grupo diverso de mamíferos grandes que incluye equinos, bovinos/vacas, cerdos, cabras, búfalos, 5 ovejas, jirafas, camellos, ciervos e hipopótamos. La mayoría de los ungulados terrestres usan las puntas de los dedos de los pies, generalmente ungulados, para sostener todo su peso corporal mientras se mueven. En algunas modalidades, el término significa, aproximadamente, "que tiene pezuña" o "animal con 10 pezuña".

Vitrificación: como se usa en la presente, el término "vitrificación" se refiere a un método para criopreservar óvulos (oocitos) y embriones. En algunas modalidades, los embriones se exponen a soluciones de equilibrado y de 15 vitrificación que comprenden crioprotectores, tales como etilenglicol o glicerol, y se sumergen en nitrógeno líquido como parte del proceso de crioconservación.

Cigoto: como se usa en la presente, el término "cigoto" se refiere a una célula formada cuando dos células de gameto 20 se unen por medio de reproducción sexual. Es la etapa de desarrollo más temprana del embrión. Un cigoto se sintetiza a partir de la unión de dos gametos, y representa la primera etapa en el desarrollo de un organismo único. Los cigotos se producen por la fertilización entre dos células haploides: un 25 óvulo (gameto femenino) y una célula de esperma (gameto

masculino), que se combinan para formar la única célula diploide.

Descripción detallada de determinadas formas de modalidad

5 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que es posible criopreservar embriones de ungulados con mejores tasas de concepción respecto de las tecnologías más estándar, cuyas tasas están normalmente muy por debajo de las tasas de concepción logradas con embriones
10 frescos.

 En algunas modalidades, la invención proporciona métodos que comprenden las etapas de: obtención de embriones producidos *in vitro*; crioconservación de los embriones; y transferencia de embriones para implantación en ungulados receptores,
15 llevando a cabo la crioconservación y la transferencia de modo tal de lograr tasas de preñez de al menos aproximadamente el 10%. En algunas modalidades, la invención proporciona embriones crioconservados por los métodos descritos. En algunas modalidades, la invención proporciona receptáculos para
20 congelación, almacenamiento y descongelación de embriones crioconservados.

Embriones producidos in vitro

 El uso de embriones producidos *in vitro* (IVP) ha aumentado mucho en la última década (Hasler, 2014). Gran parte
25 de este crecimiento se produjo principalmente en Brasil. En el

año 2013, más de 393.000 embriones IVP se transfirieron a receptores y de este total, el 78% se produjo en Sudamérica. En el mismo año, del número total de transferencias, sólo el 8,9% de embriones IVP se congeló; para embriones *in vivo*, esta
5 proporción era del 59% (Perry, 2013).

Los embriones IVP eran menos resistentes a la crioconservación que los embriones *in vivo* y el suero bovino fetal (FBS) añadido al medio de cultivo de embriones puede proporcionar mayor acumulación de embriones lipídicos
10 intracitoplasmáticos (Mucci et al., 2006) que es uno de los factores responsables de la mayor sensibilidad de los embriones IVP al congelamiento.

Actualmente, la técnica de crioconservación más comúnmente usada para embriones IVP es la vitrificación (Dode
15 et al., 2013), por su simplicidad, velocidad y bajo costo. Sin embargo, esta técnica utiliza altas concentraciones de crioprotectores y requiere de personal entrenado y una estructura de laboratorio para la recuperación de embriones antes de la transferencia (Vajta et al., 1998), restringiendo
20 su uso en el campo y en gran escala.

Por otro lado, la lenta congelación de embriones para una ulterior transferencia directa, a pesar de tener costos operativos ligeramente mayores, permite el uso de menores concentraciones de crioprotectores y, así, menor toxicidad de
25 embriones (Voelkel y Hu, 1992).

En algunas modalidades, la presente invención proporciona métodos mejorados para implantar embriones bovinos cultivados en suero. La vaca que recibe embriones fertilizados previamente incubados en suero bovino fetal (FBS) tenía
5 similares tasas de concepción que la vaca que recibió embriones sin previa exposición a FBS. En algunas modalidades, la presente invención es un método de crioconservación de embriones bovinos de modo tal que la vaca receptora tiene tasas de concepción similares a los embriones recién transferidos.
10 La vaca que recibió embriones recién fertilizados tenía similares tasas de concepción que los embriones vitrificados y los embriones de transferencia directa/congelación lenta. Esto demuestra que el método de crioconservación de embriones por la transferencia directa/congelación lenta es tan viable como
15 el método de vitrificación. Por conveniencia, la transferencia directa/congelación lenta es un sustituto apropiado para el método de vitrificación.

En algunas modalidades, antes de la fertilización y la crioconservación, los oocitos se pueden someter a una
20 maduración *in vitro*. En algunas modalidades, el oocito se incuba en presencia de oxígeno (O_2). En algunas modalidades, el oocito se incuba en presencia de dióxido de carbono (CO_2). En algunas modalidades, el oocito se incuba en presencia del 3-9% de CO_2 . En algunas modalidades, el oocito se incuba en
25 presencia del 5% de CO_2 . En algunas modalidades, el oocito se

incuba en presencia del 5% de O₂.

Cría de ganado convencional

La cría de animales es el control y el cuidado de animales de granja por seres humanos con fines de lucro, en donde están
5 más desarrollados las cualidades genéticas y el comportamiento, considerados ventajosos para los seres humanos. La expresión se puede referir a la práctica de la cría selectiva de ganado para promover rasgos deseables en animales utilitarios, deporte, ocio o investigación.

10 La cría de animales combina la técnica y la ciencia de criar animales al fusionar las prácticas consagradas y el conocimiento científico moderno en un sistema que proporciona bienestar al animal y proporciona un control y un manejo seguro y eficaz de animales. Las prácticas de la cría de animales
15 cambian en la medida en que los científicos, expertos en agricultura y otros implicados con animales aprenden nuevas técnicas o descartan aquellas que ya no son necesarias o apropiadas. Las prácticas de la cría de animales van desde el descorneamiento del ganado para evitar lesiones a los otros
20 animales del rebaño y las manos de los granjeros hasta los métodos para alojar el ganado, proporcionando una nutrición adecuada y diseñando estrategias de reproducción.

Se han desarrollado técnicas tales como inseminación artificial y transferencia de embriones y se pueden usar para
25 facilitar la reproducción. Por ejemplo, debido a que tales

tecnologías permiten que una madre lleve un embrión distinto que el propio, se pueden usar para asegurar que grandes cantidades de embriones de una madre de alta calidad particular (o línea de madres) se puedan implantar en un sustituto de menor calidad, expandiendo así el número de prole que se puede generar a partir de la madre de alta calidad. Esta práctica puede incrementar ampliamente la cantidad de descendientes que se pueden producir por medio de una pequeña selección de los animales progenitores de mejor calidad. Sin embargo, como se analiza en la presente, estas tecnologías no se han empleado normalmente con vacas lecheras. Entre otras cosas, a menudo se consideran demasiado costosas para justificar el uso con vacas lecheras. Además, en la medida en que tiendan a amplificar los rasgos genéticos particulares dentro de una manada, reducen la diversidad genética dentro de la manada, aumentando la gravedad de determinados brotes de enfermedades, entre otros. Entre otras cosas, la presente invención comprende el conocimiento de que tales técnicas, en particular cuando se combinan con estrategias de cruce, pueden proporcionar ventajas significativas en la cría de ganado vacuno en comparación con enfoques convencionales.

Tecnologías embrionarias y de fertilización

Se han de desarrollado y refinado diversas técnicas para permitir que los seres humanos controlen y/o efectúen los apareamientos animales opcionalmente sin relaciones sexuales

entre los animales (por ejemplo, servicio natural) o incluso contacto animal. Estas técnicas representativas incluyen, por ejemplo, fertilización *in vitro*, inseminación artificial, crioconservación (congelación) de gametos o embriones, inducción de múltiples ovulaciones, transferencia de embriones, determinación del sexo de espermatozoides o embriones, transferencia nuclear, clonación, etc.

La producción *in vitro* de embriones de rumiantes es un proceso en tres etapas que implican la maduración de los oocitos, la fertilización de los oocitos y el cultivo *in vitro*. Sólo el 30-40% de tales oocitos alcanzan el estado de blastocisto, en el que se pueden transferir a un receptor o se pueden congelar para un uso futuro. La calidad del oocito puede impactar dramáticamente sobre la proporción de oocitos maduros que forman blastocistos, mientras que el ambiente de cultivo posfertilización tiene una mayor influencia sobre la calidad del blastocisto. En algunas modalidades, el uso de espermatozoides de un sexo específico junto con la producción de embriones *in vitro* es un medio potencialmente eficaz para obtener descendientes del sexo deseado. Los problemas respecto del uso de la tecnología del semen sexado incluyen la aparente menor fertilidad del espermatozoides clasificado, la menor supervivencia del espermatozoides clasificado después de la crioconservación y la menor cantidad de espermatozoides que se podría separar en un período de tiempo específico. La evaluación de

la calidad del embrión es un desafío. La evaluación morfológica es actualmente el método más popular para la selección de embriones antes de la transferencia. Otros métodos de evaluación no invasivos incluyen el momento de la primera
5 división por escisión que se ligó con la capacidad de desarrollo. La examinación cuantitativa de la expresión génica es una valiosa herramienta adicional para evaluar la viabilidad de los embriones cultivados. Existe una cantidad sustancial de evidencia para demostrar que las condiciones de cultivo a las
10 que se expone el embrión, en particular en el período de posfertilización, pueden tener efectos perturbadores sobre los patrones de la expresión génica en el embrión con consecuencias potencialmente importantes a largo plazo.

IVF es una técnica en la que los oocitos se extraen de
15 una vaca donante por medio de un método de aspiración del tracto reproductivo. Los oocitos seleccionados se incuban luego durante un período de 24 horas; se denomina el período de maduración. Después de madurar, los huevos se fertilizan durante 18 a 22 horas después de realizar el cocultivo. Los
20 embriones quedan en el medio hasta el día 7, cuando ya están listos para ser transferidos. Esta técnica tiene tres ventajas principales respecto de la recolección de embriones *in vivo* convencional. Con IVF, no es necesario superovular las vacas ni es necesario sincronizarlas. Este es un gran progreso dado
25 que las vacas donantes no se exponen a hormonas que pueden

comprometer la solidez reproductiva de los animales y se puede trabajar con ellas sin un tiempo de preparación para el procedimiento. La producción de embriones es de aproximadamente el 30% en promedio de los oocitos recolectados, a pesar de que
5 esta calidad varía según la raza, la vaca donante y también el apareamiento. Otra ventaja con el IVF es que los animales se pueden aspirar cada 20 días en vez de cada 60 como en la recolección de embriones *in vivo*. La otra ventaja de IVF es que los animales pueden ser recogidos a una edad muy temprana;
10 esto creará un mayor impacto sobre la selección de cría dado que reduce el intervalo de generación para los animales con un rasgo deseable específico.

La inseminación artificial (AI) se ha usado para obtener descendientes de machos genéticamente superiores durante más
15 de 200 años. Los métodos bien conocidos para criopreservar (congelar) y almacenar semen volvieron accesible a la AI para mayor cantidad de productores ganaderos. De la misma manera que la crioconservación de semen, la congelación de embriones permitía la comercialización global de animales con altas
20 calidades genéticas. El semen de los toros es especialmente susceptible a la congelación y el almacenamiento a largo plazo. En la industria lechera, donde se manejan intensamente grandes cantidades de vacas lecheras, AI es simple, económica y exitosa. Más del 60 por ciento de las vacas lecheras en los
25 Estados Unidos se reproducen con AI. Sin embargo, la situación

es diferente para el ganado vacuno, donde las poblaciones de cría se mantienen usualmente en condiciones de pastos o pasturas. En la industria de la carne en los Estados Unidos, AI representa menos del 5 por ciento de las inseminaciones.

5 El desarrollo de la tecnología ET permite que los productores obtengan múltiple prole de hembras genéticamente superiores. Los embriones fertilizados se pueden recuperar de las hembras (también denominadas donantes de embriones) de superior mérito genético por técnicas quirúrgicas
10 o no quirúrgicas. Los embriones genéticamente superiores se transfieren luego a las hembras (también denominadas receptoras de embriones) de menor mérito genético. En las vacas, las técnicas eficaces pueden recuperar embriones fertilizados sin cirugía, pero sólo uno o a veces dos embriones se producen
15 durante cada ciclo reproductivo normal. Para incrementar la cantidad de embriones que se pueden recuperar de hembras genéticamente superiores, la donante de embriones se trata con un régimen de hormonas para inducir múltiples ovulaciones o una superovulación.

20 La industria de la carne en los Estados Unidos prefiere terneros machos que tienden a tener mayores pesos corporales y mayor eficacia de alimentación (en comparación con terneras) cuando se colocan en corrales de engorde para las etapas de crecimiento y acabado de producción de carne. Por el contrario,
25 la industria lechera prefiere terneras que producirán por

último descendientes y leche para el consumo humano. De esta manera, se necesitan métodos para determinar el sexo del esperma o los embriones para que los productores puedan controlar el sexo de la descendencia de su ganado.

5 Desde mediados de 1980, se ha desarrollado tecnología para transferir el núcleo de un blastómero (células de embriones en estado de escisión temprano y presumiblemente no diferenciado) o una célula somática (fibroblasto, piel, corazón, nervio u otra célula corporal) a un oocito enucleado
10 (óvulo hembra no fertilizado con el núcleo removido). Esta "transferencia nuclear" produce múltiples copias de animales que en sí son copias casi idénticas de otros animales (animales transgénicos, animales genéticamente superiores o animales que producen altas cantidades de leche o tienen cierto otro rasgo
15 deseado, etc.). Este proceso también se denomina clonación. Hasta la fecha, se ha usado la transferencia nuclear de células somáticas para clonar vacas, ovejas, cerdos, cabras, caballos, mulas, gatos, conejos, ratas y ratones.

La técnica implica el cultivo de células somáticas de un
20 tejido apropiado (fibroblastos) del animal por clonar. Los núcleos de las células somáticas cultivadas se microinyectan luego en un oocito enucleado obtenido de otro individuo de la misma especie o de una especie íntimamente relacionada. Por medio de un proceso que aún no es comprendido, el núcleo de la
25 célula somática se reprograma en un patrón de expresión génica

apropiado para direccionar el desarrollo normal del embrión. Después del cultivo y el desarrollo *in vitro*, los embriones se transfieren a una hembra receptora y por último resulta el nacimiento de la cría viva. La tasa de éxito para la propagación de animales por transferencia nuclear a menudo es inferior al 5 por ciento y depende de varios factores, incluyendo la especie, la fuente de los óvulos, el tipo celular de los núcleos donantes, el tratamiento de las células donantes antes de la transferencia nuclear, las técnicas usadas para la 10 transferencia nuclear, etc.

La presente descripción demuestra la eficacia de tecnologías de crioconservación mejoradas para congelar y descongelar embriones de ungulados. La presente descripción demuestra que tales tecnologías pueden ofrecer significativos 15 beneficios a la industria de las vacas lecheras.

En algunas modalidades, los embriones preservados se pueden suministrar a otras granjas y negocios, por ejemplo, para permitir que generen una progenie y/o manadas híbridas. En algunas modalidades, la presente invención permite un método 20 comercial de selección de ganado vacuno híbrido y recreación de ganado vacuno híbrido de alto rendimiento por reproducción selectiva usando los gametos F0 de sus progenitores.

Crioprotectores

Como se observa en la presente, la presente invención 25 proporciona tecnologías para la crioconservación de embriones

bovinos y/o para lograr la fertilización con embriones bovinos
crioconservados. En algunas modalidades, los crioprotectores
para usar de acuerdo con la presente invención son o comprenden
crioprotectores intracelulares. En algunas modalidades, los
5 crioprotectores para usar de acuerdo con la presente invención
son o comprenden crioprotectores extracelulares. En algunas
modalidades, los crioprotectores de ejemplo (por ejemplo, para
usar como crioprotectores intracelulares) pueden ser o pueden
comprender: dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol,
10 polietilenglicol (PEG) y combinaciones de ellos. En algunas
modalidades, los crioprotectores de ejemplo (por ejemplo, para
usar como crioprotectores extracelulares) pueden ser o pueden
comprender: sacarosa, trehalosa, dextrosa y combinaciones de
ellos. En algunas modalidades particulares, los
15 crioprotectores para usar de acuerdo con la presente invención
pueden ser o pueden comprender propilenglicol.

Estados de desarrollo embrionario

En algunas modalidades, los embriones se pueden
criopreservar en distintos estados de desarrollo. En algunas
20 modalidades, los embriones se pueden criopreservar en una etapa
de desarrollo seleccionada del grupo que consiste en: mórula,
blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido.
Después de la formación de blastocistos, el embrión se prepara
para implantación en la pared uterina. En algunas modalidades,
25 el estado de blastocisto temprano se caracteriza porque una

cavidad recién comienza a formarse y las células blastocísticas aún no son distinguibles. En algunas modalidades, el estadio de blastocisto expandido se caracteriza por una cavidad completamente formada.

5 Dispositivos para crioconservación

La presente invención proporciona dispositivos para la crioconservación de embriones. En algunas modalidades, los dispositivos comprenden un embrión crioconservado en solución de crioconservación ubicado dentro de una primera región dentro
10 del dispositivo, cuya primera región está flanqueada por: segunda y tercera región, cada una de las cuales está compuesta por aire, cuya segunda y tercera región están flanqueadas por: cuarta y quinta región, cada una de las cuales está compuesta por soluciones de descongelación, cuya cuarta y quinta región
15 están flanqueadas por: sexta y séptima región, cada una de las cuales está compuesta por aire, cuya sexta y séptima región están flanqueadas por: octava y novena región, cada una de las cuales está compuesta por soluciones de descongelación. En algunas modalidades, una o varias regiones del dispositivo son
20 una cámara.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una pluralidad de los dispositivos para la crioconservación de embriones. En algunas modalidades, cada pluralidad de dispositivos contiene un embrión de un
25 apareamiento simple.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona métodos que comprenden las etapas de preparación de pluralidad de embriones; crioconservación de la pluralidad de embriones; y transferencia de los embriones con una tasa de

5 concepción de aproximadamente el 40%. En algunas modalidades, los embriones se almacenan opcionalmente durante un período de tiempo entre la crioconservación y la transferencia a vacas receptoras. En algunas modalidades, el período de tiempo entre la crioconservación y la transferencia a vacas receptoras son

10 minutos, horas, días, semanas, meses, años o más (por ejemplo, sus múltiplos). En algunas modalidades, los embriones se almacenan durante un período de tiempo inferior a

aproximadamente 40 años, aproximadamente 35 años, aproximadamente 30 años, aproximadamente 25 años,

15 aproximadamente 20 años, aproximadamente 15 años, aproximadamente 10 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 3 años,

20 aproximadamente 2 años o aproximadamente 1 año. En algunas modalidades, los embriones se almacenan durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 12, aproximadamente 11, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5,

25 aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2,

aproximadamente 1 meses o menos. En algunas modalidades, los embriones se almacenan durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 3 semanas, 5 aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 semana o menos. En algunas modalidades, los embriones se almacenan durante un período de tiempo de time inferior a aproximadamente 7 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 3 días, 10 aproximadamente 2 días o aproximadamente 1 día. En algunas modalidades, los embriones se almacenan durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 4 horas, 15 aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas o aproximadamente 1 hora. En algunas modalidades, los embriones se almacenan durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 30 minutos, 20 aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 2 minutos o aproximadamente 1 minuto.

En algunas modalidades, los embriones se pueden almacenar 25 durante minutos, días o años antes de transferir a vacas

receptoras. En algunas modalidades, el período de tiempo en que se pueden almacenar los embriones puede ser de minutos, horas, días, semanas, meses, años o más (por ejemplo, sus múltiplos). En algunas modalidades, los embriones se almacenan

5 durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 40 años, aproximadamente 35 años, aproximadamente 30 años, aproximadamente 25 años, aproximadamente 20 años, aproximadamente 15 años, aproximadamente 10 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 8 años,

10 aproximadamente 7 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 2 años o aproximadamente 1 año. En algunas modalidades, los embriones se almacenan durante un período de tiempo inferior a

15 aproximadamente 12, aproximadamente 11, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1 mes o menos. En algunas modalidades, los embriones se almacenan

20 durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 semana o menos. En algunas modalidades, los embriones se almacenan durante un período de tiempo inferior a

25 aproximadamente 7 días, aproximadamente 6 días,

aproximadamente 5 días, aproximadamente 4 días,
aproximadamente 3 días, aproximadamente 2 días o
aproximadamente 1 día. En algunas modalidades, los embriones
se almacenan durante un período de tiempo inferior a
5 aproximadamente 24 horas, aproximadamente 20 horas,
aproximadamente 16 horas, aproximadamente 12 horas,
aproximadamente 8 horas, aproximadamente 4 horas,
aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas o
aproximadamente 1 hora. En algunas modalidades, los embriones
10 se almacenan durante un período de tiempo inferior a
aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 50 minutos,
aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 30 minutos,
aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 10 minutos,
aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 4 minutos,
15 aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 2 minutos o
aproximadamente 1 minuto.

En algunas modalidades, la etapa de crioconservación
comprende realizarla en un dispositivo. Los embriones se pueden
criopreservar dentro de dispositivos de acuerdo con los métodos
20 descritos en la presente. En algunas modalidades, la etapa de
crioconservación comprende criopreservar una pluralidad de los
embriones, cada uno en su propio dispositivo, de modo que se
genera un grupo de dispositivos. En algunas modalidades, una
pluralidad de dispositivos se mantiene durante un primer
25 período de tiempo. En algunas modalidades, después del primer

período de tiempo, al menos un embrión se transfiere a la vaca receptora; y opcionalmente, los demás embriones se mantienen durante un segundo período de tiempo. En algunas modalidades, el período de tiempo puede ser de hasta 40 años. En algunas

5 modalidades, los embriones se pueden almacenar durante minutos, días o años antes de transferir a la vaca receptora. En algunas modalidades, el segundo período de tiempo en que se pueden almacenar los embriones puede ser de minutos, horas, días, semanas, meses, años o más (por ejemplo, sus múltiplos). En

10 algunas modalidades, los embriones se almacenan durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 40 años, aproximadamente 35 años, aproximadamente 30 años, aproximadamente 25 años, aproximadamente 20 años, aproximadamente 15 años, aproximadamente 10 años,

15 aproximadamente 9 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 2 años o aproximadamente 1 año. En algunas modalidades, los embriones

20 se almacenan durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 12, aproximadamente 11, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1 mes o

25 menos. En algunas modalidades, los embriones se almacenan

durante un período de tiempo inferior a aproximadamente 6
semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 4 semanas,
aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 2 semanas,
aproximadamente 1 semana o menos. En algunas modalidades, los
5 embriones se almacenan durante un período de tiempo inferior a
aproximadamente 7 días, aproximadamente 6 días,
aproximadamente 5 días, aproximadamente 4 días,
aproximadamente 3 días, aproximadamente 2 días o
aproximadamente 1 día. En algunas modalidades, los embriones
10 se almacenan durante un período de tiempo inferior a
aproximadamente 24 horas, aproximadamente 20 horas,
aproximadamente 16 horas, aproximadamente 12 horas,
aproximadamente 8 horas, aproximadamente 4 horas,
aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas o
15 aproximadamente 1 hora. En algunas modalidades, los embriones
se almacenan durante un período de tiempo inferior a
aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 50 minutos,
aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 30 minutos,
aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 10 minutos,
20 aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 4 minutos,
aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 2 minutos o
aproximadamente 1 minuto.

En algunas modalidades el dispositivo comprende un
receptáculo para contener uno o varios embriones
25 crioconservados. En algunas modalidades, el receptáculo

comprende regiones o cámaras para contener embriones en solución flanqueadas por burbujas de aire. En algunas modalidades, el receptáculo comprende regiones o cámaras para separar unos embriones de otros embriones. En algunas
5 modalidades, el receptáculo comprende una pajuela.

Ejemplificación

El objetivo de este estudio fue comparar las tasas de preñez obtenidas después IVP ET de embriones bovinos frescos, vitrificados o congelados para transferencia directa. Unos
10 oocitos ($n = 3171$) recuperados por OPU Girolando en hembras fueron seleccionados y enviados a IVM durante 24 horas a $38,5^{\circ}\text{C}$ con CO_2 al 5% en aire y humedad saturada. La IVF se efectuó con semen sexado descongelado, realizado con 5 toros Holstein. Después de la IVFR, los presuntos cigotos se desnudaron y
15 cultivaron durante siete días en las mismas condiciones de temperatura y humedad de IVM e IVF, pero con CO_2 al 5% y CO_2 al 5%. Los embriones de grado I en las etapas de BL o BX se transfirieron en fresco, vitrificados o congelados para transferencia directa (DT). Los embriones se transfirieron a
20 receptores previamente sincronizados. Las tasas de concepción obtenidas fueron del 51,35% (133/259) en embriones frescos, del 34,62% (84/234) en embriones vitrificados y del 42,11% (96/228) en los embriones de transferencia directa. El nivel de probabilidad de $p < 0,05$ se consideró significativo. Las
25 tasas obtenidas de los embriones IVP vitrificados y la

transferencia directa indican que la crioconservación de embriones IVP produce resultados similares a los obtenidos después de la transferencia de embriones frescos IVP. Se destacan los aspectos positivos de la posibilidad de la crioconservación de embriones IVP con la conveniencia de la transferencia directa.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Excepto donde se indicó, todos los reactivos se compraron en Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). Los procedimientos de aspiración folicular, la maduración *in vitro* y la fertilización *in vitro* descritos en los Ejemplos 1-3 se usaron para los Ejemplos 4 y 5.

Ejemplo 2: Recolección de oocitos y maduración *in vitro*

El trabajo se llevó a cabo con la finalización de la recogida de 112 óvulos (OPU) guiada por ultrasonidos en 36 donantes hembras $\frac{1}{2}$ sangre de la craza Gir and Holstein. Después de la sesión de aspiración, se lavaron los oocitos (n = 3171) en medio TCM-199 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) tamponado con Hepes suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) (GIBCO BRL; Grand Island, NY), piruvato sódico 0,20 mM y 83,4 mg/ml de amikacina (BIOCHIMICO Institute, Río de Janeiro, Brasil). Los oocitos fueron preseleccionados y clasificados en un laboratorio móvil instalado en la granja. Después de la selección de los oocitos, se los transportó al laboratorio en un tubo BD Falcon 5 ml de poliestireno que

contenía 400 μ l de medio TCM-199 suplementado con FBS al 10%, 1 mg/ml de FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont., Canadá), 50 mg/ml de hCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil) y estradiol (1 mg/ml), piruvato
 5 de sodio 0,20 mM y 83,4 mg/ml de amikacina, cubierto por 350 μ L de aceite mineral. Los oocitos recuperados se transportaron al laboratorio ubicado en Mogi Mirim/SP y se guardaron en el mismo tubo de transporte con medio de maduración durante 24 horas, contados a partir del momento
 10 de la OPU.

Ejemplo 3: Preparación de semen y fertilización in vitro (IVF)

La IVF se realizó con semen de toros Holstein (n = 5) sexados para hembra. Se descongeló el semen (35 °C durante
 15 30 segundos) y se lavó dos veces por centrifugación (6000 rpm durante 5 minutos) en 1 ml de TALP complementado con piruvato 0,2 mM y amikacina 83,4 g/ml, tamponado con Hepes 10 mM. La concentración de semen se ajustó a 2×10^6 espermatozoides (sptz) móviles/mL. La dosis de inseminación
 20 fue de 10 microlitros (10^5 sptz) a cada gota de 50 μ L de TALP-FIV (TALP suplementado con 10 g/mL de heparina, penicilamina 18 M, hipotaurina epinefrina 10 M y 8 M) en aceite mineral. Más tarde, se agregaron 25-30 oocitos en cada gota. La incubación fue durante 20-24 h en una
 25 incubadora a 38,5 °C con CO₂ al 5% y humedad máxima en el

aire.

Ejemplo 4: Experimento I - Embriones IVP frescos transferidos en la presente o ausencia de suero bovino fetal (FBS)

5 Embriones de cultivo in vitro ((IVC)

Se recogieron oocitos (n = 665) por aspiración folicular guiada por ultrasonido de donantes de Girolando (n = 25). Estos fueron sometidos a fertilización *in vitro* con semen sexado del mismo toro Holstein, con una distribución
10 aleatoria de oocitos entre los grupos.

Grupo con FBS - Se cultivaron cigotos presuntos (n = 303) en gotas de 100 µl de SOF (fluido oviductal sintético) (Wells et al., 1999) complementado con FBS al 2,5% + albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA) en aceite mineral. En el tercer
15 día (D3) y en el día (D5) de IVC, se realizó sustituyendo el 50% del volumen de gotas por un nuevo medio ("alimentación"). El medio de cultivo de "alimentación" con el mismo medio que se usó en el desarrollo embrionario temprano.

20 **Grupo sin FBS** - Unos cigotos presuntos (n = 362) se cultivaron en gotas de 100 µL de SOF modificado sin usar FBS y se suplementaron sólo con albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA) + EDTA 10 µM en aceite mineral. En el día tres (D3) y en el día cinco (D5) de IVC se realizó sustituyendo el 50%
25 del volumen de gotas por un nuevo medio ("alimentación").

El medio de cultivo para "alimentar" el mismo medio se usó en el desarrollo embrionario temprano.

Después de 7 días de cultivo, los embriones de los grupos con (n = 82) o sin FBS (n = 88) se transfirieron en fresco a vacas receptoras previamente sincronizadas. Las hembras fueron utilizadas como receptoras en el primer tercio de la lactancia. Para la sincronización de las receptoras, se utilizó el siguiente protocolo:

- Día cero (D0) - 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®) + colocación de implante intravaginal (CIDR®)

- Día siete (D7) - 5 mL de prostaglandina F2á (Lutalyse®)

- Día nueve (D9) - Extracción del implante y aplicación de 1 mg de cipionato de estradiol (ECP®)

- Día dieciocho (D18) - Transferencia de embriones

En el Experimento 1, las tasas de concepción se compararon en embriones cultivados en dos medios diferentes, complementados o no con FBS. Como se puede ver en la Tabla 1, no hubo diferencia entre los dos grupos. Este ejemplo demuestra que los embriones frescos cultivados en medios suplementados con FBS tienen una viabilidad y tasas de concepción similares a las de los embriones que no crecieron en FBS.

Tabla 1. Coeficiente de concepción de embriones frescos transferidos, cultivados con o sin FBS.

GRUPO	OOCITOS	EMBRIONES	CONCEPCIÓN	CONCEPCIÓN
		TRANSFERIDOS	30 DÍAS (%)	60 DÍAS (%)
2,5% de FBS	303	82	33 (37,5%) ^a	31 (35,23%) ^a
Sin FBS	362	88	38 (46,34%) ^a	30 (36,59%) ^a

^a $p < 0,05$

Ejemplo 5: Comparación de coeficientes de concepción de embriones IVP transferidos en fresco, vitrificados o congelados para transferencia directa

10 Cultivo in vitro (IVC) de embriones

Después de los procedimientos descritos en los Ejemplos 2 y 3, los cigotos presuntivos se cocultivaron (grupos aleatorios de 25 oocitos por gota) en la incubadora (38,5 °C con CO₂ al 5% y humedad máxima en aire) con células de granulosa. Los embriones para transferencia en fresco o vitrificación se cultivaron en gotas de 100 µL de SOF (Wells et al., 1999) complementado con FBS al 2,5% + albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA) en aceite mineral. En el tercer día (D3) y en el día quinto (D5) de VCI se realizó sustituyendo el 50% del volumen de gotas por un nuevo medio ("alimentación"). El medio de cultivo de "alimentación" fue el mismo medio utilizado en el desarrollo embrionario temprano. La tasa de escisión se evaluó en el tercer día de cultivo (D3).

Se cultivaron embriones para congelación por transferencia directa en gotas de 100 µL de SOF modificado sin

FBS y se suplementaron únicamente con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% + EDTA 10 μ M en aceite mineral. En el tercer día (D3) y en el quinto día (D5) de VCI se realizó sustituyendo el 50% del volumen de gotitas por un nuevo medio ("alimentación").

5 El medio de cultivo de "alimentación" fue el mismo medio utilizado en el desarrollo embrionario temprano. La tasa de escisión se evaluó en el tercer día de cultivo (D3).

Al final del período de cultivo (D7), los blastocistos expandidos clasificados como grado 1, se cargaron y
10 transfirieron en fresco a receptoras previamente sincronizadas. En ausencia de receptoras disponibles para todos los embriones producidos, los embriones sobrantes se vitrificaron siguiendo el protocolo descrito por SANCHES et al. (2013) o se congelaron para su transferencia directa
15 posterior.

Vitrificación de embriones

En este trabajo, los embriones se criopreservaron para el método de vitrificación de acuerdo con el protocolo previamente descrito por SANCHES et al., 2013.

20 En pocas palabras, unos embriones (Bx, n = 234) se expusieron a 1 min en solución de equilibrio (SE = 10% de EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y luego durante 20 segundos en la solución de vitrificación (VS = 20% EG + DMSO al 20%). Durante los 20 segundos de exposición a la solución de
25 vitrificación, los embriones se alojaron en Cryotop® (Kitazato

- Shizuoka - Japón), a razón de tres a cinco embriones por Cryotop y se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido. La vitrificación de los embriones se basó en la técnica Cryotop, descrita por KUWAYAMA et al. (2005). Esta metodología utiliza el concepto de volumen mínimo, donde los embriones se colocan en una película de plástico muy delgada unida a una varilla de material plástico utilizada para facilitar la manipulación. Las soluciones de vitrificación utilizadas se prepararon en una placa de cuatro cavidades (NUNC S/A, Roskilde, Dinamarca).

El medio TCM-HEPES (TCM-199 + 25 mM de Hepes + 10% de FBS) era la base para la preparación de soluciones que contienen EG y DMSO, y se agregaron sólo al momento de usar. En ambos grupos, la solución de equilibrio (ES) se complementó con 20% de SFB y se añadió a la solución de vitrificación (VS) sacarosa 0,5 M.

Primero, los embriones se colocaron en un medio de mantenimiento (TCM-HEPES), donde se retiraron (de tres a cinco cada uno) y se pasaron a la cavidad 1, que contenía ES. En esta solución, los embriones se mantuvieron durante un minuto y poco después se transfirieron a la cavidad 2, que contenía VS, que se expusieron durante 20 segundos. Por lo tanto, los embriones se pipetearon inmediatamente y se alojaron sobre la película de material plástico en punta Cryotop y la muestra se sumergió en nitrógeno líquido.

Descongelación de embriones vitrificados

Para la descongelación de embriones vitrificados, los

Cryotops que contenían los embriones se expusieron al aire durante cuatro segundos y luego se sumergieron durante la solución de calentamiento (TCM-Hepes + sacarosa 0,3 molar) con una temperatura aproximada de 35 °C. La remoción de la solución de vitrificación se realizó con dos tiempos de exposición (de 5 minutos cada uno) en gradientes de sacarosa 0,3 M y 0,15, respectivamente, antes de pasar al medio de mantenimiento TCM-Hepes (Vieira et al., 2002; Mezzalira et al, 2004).

Congelación lenta de los embriones

En total, los embriones (n = 228) se criopreservaron mediante el método de congelación lenta descrito previamente para embriones obtenidos *in vivo* (Voelkel y Hu, 1992). El blastocisto y el blastocisto expandido se expusieron a una solución de congelación (SC), que consistía en 1,5 M de etilenglicol durante 10 minutos. El plato que contenía el SC y los embriones quedaron en la placa calentada a 35 °C durante este período. Los embriones se cargaron en pajuelas de 0,25 ml y el embrión se colocó en una columna central, que consistía en 1,5 M de solución de etilenglicol, rodeada por cuatro columnas de solución de descongelación (SD), intercaladas con columnas de aire una de la otra (Figura 1). La solución de descongelación (SD) estaba compuesta por 0,75 M EG. La EG 1,5 M se diluyó en DPBS (Nutricell - Campinas - Brasil) en una proporción de 1:1. Después de cargarse, los embriones se colocaron en una máquina de congelación (TK 1000® - Uberaba -

Brasil), previamente estabilizada a -6°C . Dos minutos después de ser colocados en la máquina, se realizó la cristalización ("siembra") de las columnas inmediatamente por encima y por debajo de la columna de embriones. Los embriones se mantuvieron
5 durante 10 minutos a -6°C .

Se inició la curva de congelación, bajando la temperatura a $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta alcanzar un nivel de -32°C . Al final de la curva de congelación, los embriones se sumergieron directamente en nitrógeno líquido, donde se almacenaron antes
10 de ser transferidos a la receptora. Ver también la Figura 2A para una descripción general.

Descongelación y transferencia directa

En el momento de la transferencia de los embriones crioconservados para su transferencia directa, se extrajeron
15 los embriones del contenedor de nitrógeno líquido, se expusieron al aire a temperatura ambiente durante 10 segundos y luego se sumergieron en agua caliente a 35°C durante 30 segundos. La pajuela se secó con toallas de papel y se agitó suavemente hasta que las 5 columnas del interior se mezclaron.
20 El objetivo era que las 4 columnas de solución de descongelación se mezclaran con la columna de solución de congelación, para la rehidratación ya iniciada dentro de la paja. Después de mezclar las columnas, el embrión se transfirió al cuerno uterino de la receptora. Ver también la Figura 2B
25 para una descripción general.

Las hembras utilizadas como receptoras de embriones frescos, vitrificadas o de transferencia directa se encontraban en el primer tercio de la lactancia. El protocolo de sincronización fue el mismo usado en el Ejemplo 4.

5 Análisis estadístico

Las tasas de concepción a los 30 y 60 días se analizaron mediante regresión logística binomial de IBM SPSS Statistics versión 22 (IBM Inc., Armonk, NY), considerando las variables del protocolo de sincronización, edad de la receptora, 10 categoría del animal (lactante o seca) y el toro utilizado en la IVF como efectos fijos. El nivel de probabilidad $p < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

En el Ejemplo 5, las tasas de concepción se compararon a 15 los 30 y 60 días de embriones frescos transferidos, vitrificados o congelados para transferencia directa (Tabla 2). En este caso, hubo una diferencia entre la tasa de concepción de embriones frescos transferidos al 51,35% (133/259) en comparación con ambos grupos con embriones 20 crioconservados. Sin embargo, no hubo diferencias ($p < 0,05$) en las tasas de concepción para los embriones vitrificados 34,62% (84/234) en comparación con los embriones de transferencia directa 42,11% (96/228).

Tabla 2. Comparación entre la tasa de concepción a los 25 30 y 60 días de los embriones IVP transferidos en fresco,

vitricificados o congelados para la transferencia directa y el porcentaje de pérdidas fetales producida en los 3 grupos en el mismo período.

5	EMBRIONES	EMBRIONES TRANSFERIDOS	CONCEPCIÓN 30 DÍAS (%)	CONCEPCIÓN 60 DÍAS (%)	% DE PÉRDIDA (30-60 DÍAS)
	Fresco	259	133 (51,4%) ^a	112 (43,2%) ^a	15,8%
10	Vitrificado	234	84 (34.6%) ^b	73 (31,2%) ^b	9,9%
	Transferencia directa	311	125 (40,19%) ^b	108 (34,72%) ^b	13,6%

^{a, b} $p < 0,05$

Análisis

15 Se detallan las comparaciones de las tasas de concepción de embriones IVP transferidos en fresco, vitricificados o congelados para transferencia directa. Este es el primer estudio de este tipo, particularmente en cuanto a la cantidad constante de embriones transferidos, en el ganado vacuno
20 indicus-aurus.

Los datos presentados por Perry (2014) para el año 2013 mostraron que solo el 8,9% de los embriones IVP transferidos en todo el mundo se criopreservaron. Sin querer estar sujetos a ninguna teoría en particular, proponemos que esta baja tasa
25 puede deberse a una mayor sensibilidad y/o menor viabilidad

(por ejemplo, cuando se exponen a tecnologías de revitalización y/o transferencia de embriones) de estos embriones crioconservados en comparación con los embriones frescos; esta baja tasa es un aspecto limitante en el uso de esta tecnología para la mayoría de los laboratorios comerciales (George, 2008). Sin embargo, dado el número creciente de embriones IVP producidos, se ha vuelto crucial encontrar estrategias apropiadas para la crioconservación de embriones *in vitro*.

El mundo dispone de más del 90% de los embriones producidos *in vitro* (Perry, 2014) que refleja una pérdida más amplia, cuando se considera material genético, suministros, materiales y mano de obra. Además, la logística de administrar embriones a las receptoras se vuelve más crítica cuando se requiere trabajar con embriones frescos solamente. Por todas estas desventajas, el descarte de embriones sobrantes aumenta el costo de la técnica y la hace menos rentable y competitiva. Según PONTES, (2013), la Vitro Brazil Company descartó aproximadamente 25.000 embriones IVP, entre los años 2002 a 2008, porque no existía un protocolo de crioconservación bien establecido.

Además de los desafíos asociados con la crioconservación y/o de embriones crioconservados, parece que ha habido una brecha considerable en las técnicas adaptadas a diferentes tipos de raza de animales bovinos. Se sabe que hay varias diferencias reproductivas entre los animales taurus e indicus.

Por ejemplo, una diferencia son las características de los orgánulos. Trabajando con embriones *in vivo*, VISINTIN et al. (2002) demostraron características específicas entre los embriones *Bos indicus* y *Bos taurus*, especialmente la cantidad
5 de lípido intracitoplasmático. Teniendo en cuenta las condiciones climáticas y geográficas reinantes en Brasil, el objetivo de este trabajo se llevó a cabo utilizando embriones de un rebaño lechero de taurus-indicus, compuesto por el donante Girolando. Esta craza es responsable del 80% de la
10 producción de leche en Brasil, debido a su buena adaptabilidad para la producción de leche en pastos y a un costo menor (Girolando, 2015).

El interés en la producción de embriones de hembras Girolando ha proporcionado varias publicaciones en los últimos
15 años. PONTES et al. (2010) compararon la producción de embriones en aspiraciones foliculares mantenidas en donantes de Holstein, Gir y Gir. En este estudio, observamos una mayor producción de embriones/aspiración en vacas Gir que en Holstein (3.2 vs. 2.2, respectivamente). Sin embargo, la producción de
20 embriones fue mayor en promedio dos veces más alta (5,5 blastocistos) en Girolando en comparación con las otras dos razas. La presente descripción reconoce que el rendimiento superior en embriones IVP de taurus indicus permite el desarrollo de tecnologías de crioconservación embrionarias
25 mejoradas, por ejemplo, a la luz de la abundancia de muestras

en los experimentos de viabilidad y la obtención de preñeces.

Los embriones IVP son menos tolerantes a los crioprocesos con los embriones *in vivo* (Abe et al., 2002) y las causas de esta sensibilidad aumentada se atribuyeron principalmente a una mayor acumulación de lípidos intracelulares que se encuentran en el citoplasma de embriones IVP (Abe et al. al, 2002; Rizos et al, 2002; Sudano et al., 2011). En este contexto, el suero bovino fetal (FBS) como suplemento del medio utilizado en cultivo se identificó como responsable de la menor supervivencia embrionaria después de la congelación (Diez et al., 2001; Abe et al, 2002; Lonergan et al 2003). Sin embargo, la mayor concentración de gotas de lípidos intracitoplasmáticos no puede considerarse el único factor perjudicial para la crioconservación; un problema es multifactorial e implica el estricto control de calidad en todas las etapas de la IVP en la obtención de una calidad embrionaria apta para la crioconservación (Sudano et al., 2013).

En el Ejemplo 4, se realizaron aspiraciones foliculares en el mismo grupo de donantes y se cultivaron embriones en ausencia o presencia de FBS. El objetivo era comparar las tasas de preñez en ambos grupos (con o sin FBS) en embriones frescos transferidos. Hay algunos informes (George et al., 2008) de mayor elongación del feto y de disco embrionario más evidente en aquellos embriones IVP cultivados con BSA, en comparación con los embriones cultivados con FCS (suero de ternero fetal).

Las comparaciones directas entre estos trabajos fueron valiosas, por ejemplo, porque la mayoría de los otros trabajos sólo evalúan las tasas de reexpansión y las tasas de eclosión de los embriones, sin llegar a transferir los embriones
5 producidos. Además, existen muchas diferencias entre la composición del medio de cultivo y las condiciones de cultivo en cada uno de estos estudios.

En los estudios descritos en el Ejemplo 4, no se observaron diferencias en la preñez ($P < 0,05$) entre los grupos,
10 lo que nos permitió concluir que dispensar FBS para el cultivo *in vitro* daba como resultado una serie de preñeces compatibles con no usar FBS.

La presente descripción tiene presente que, aparte de considerar FBS y las condiciones de cultivo, hay otro aspecto
15 importante a considerar: el crioprotector. Los protocolos de crioconservación deberían evitar la formación de cristales de hielo intracelulares e intentar minimizar el estrés tóxico y osmótico de las células durante la congelación (Campos-Chillon et al., 2006). Por lo tanto, muchos de los agentes
20 crioprotectores tales como glicerol y etilenglicol (EG) son tóxicos para los embriones (Dochi et al., 1988). Disminuir el tiempo que el embrión está expuesto a estos agentes crioprotectores antes de la congelación y después de la descongelación puede reducir los efectos tóxicos, logrando una
25 mayor viabilidad embrionaria después de la descongelación

(Sommerfield y Niemann, 1999).

A principios de la década de 1990, Voelkel y Hu (1992) demostraron que el uso de etilenglicol como crioprotector podría ser una alternativa de la transferencia directa de
5 embriones congelados-descongelados, con tasas de concepción ligeramente menores que las obtenidas con embriones frescos (Voelkel Hu, 1992, Leibo y Mapletoft, 1998). El método de transferencia directa permite el paso de la rehidratación en las células embrionarias después de la descongelación, se puede
10 simplificar, lo que lo hace una técnica fácil de implementar en el campo. Desde entonces, la transferencia directa ha sido ampliamente aceptada para la congelación de embriones producidos *in vivo*, recolectados de donantes superovuladas.

Sin embargo, para los embriones IVP, el método más
15 ampliamente utilizado para la congelación de embriones IVP es la vitrificación (Morató y Mogas, 2014), principalmente debido a la velocidad de congelación y bajo costo. Esto hizo que la transferencia de embriones fuera una tecnología mucho más eficiente, que ya no depende de la disponibilidad de receptoras
20 sincronizadas. Cualquiera sea el método de congelación, vitrificación o transferencia directa, las tasas de concepción son más bajas que las obtenidas con embriones frescos (Leibo y Mapletoft, 1998). La desventaja de la vitrificación es la necesidad de un embriólogo calificado para realizar el
25 recalentamiento de embriones, que está más allá de la

estructura mínima requerida para un laboratorio, lo que complica aún más su aplicación en el campo y en gran escala (Morató y Mogas, 2014).

En el presente estudio, hemos utilizado el protocolo de congelación lenta (transferencia directa) de embriones con etilenglicol 1,5 M como crioprotector para embriones. Sin embargo, en experimentos previos llevados a cabo por nuestro grupo, hemos encontrado que cuando los embriones se congelaban en la columna central en etilenglicol 1,5 M y las columnas laterales estaban compuestas sólo de DPBS, los embriones tenían menores tasas de eclosión después del descongelamiento. Sin querer estar sujetos a ninguna teoría en particular, proponemos que una explicación para nuestras observaciones era que los embriones se rehidrataban muy rápidamente cuando estaban en contacto directo con la posdescongelación DPBS.

Se eligió examinar el uso de una solución de descongelación compuesta de etilenglicol 0,75 M, dispuesta en cuatro columnas en ambos lados del embrión. De esta forma, la entrada de agua en las células embrionarias podría ocurrir más lentamente, manteniendo su integridad. Se presentó una estrategia similar para congelar embriones *in vivo*, utilizando columnas laterales al embrión, que consiste en una solución llamada "medio de retención", compuesta por etilenglicol 0,37 M (Voekel y Hu, 1992). En el trabajo, la tasa de preñez para el grupo experimental fue la misma que para el grupo de control

(50%). A pesar de que las tasas de preñez son relativamente bajas, de aproximadamente el 40%, es importante considerar que los embriones *in vivo* reducen el estrés para su desarrollo y proporcionan mayores tasas de preñez. Por lo tanto, la
5 estrategia del envasado de embriones indicus-taurus producidos *in vitro* puede considerarse exitosa.

Otro punto importante observado en tales estudios fue la tasa más baja de supervivencia de embriones después de la congelación cuando se trataba de embriones de IVP
10 crioconservados en estadio de mórula compacta, en comparación con los embriones clasificados como blastocisto y blastocisto expandido. Resultados similares fueron encontrados por autores que revisaron la mórula y el blastocisto de la tasa de eclosión, como un indicador de la supervivencia de los embriones después
15 de la crioconservación por el método lento (Pollard y Leibo, 1993), pero no hay consenso sobre la mejor etapa para la crioconservación embrionaria (Saragusty y Arav, 2011).

La tasa de concepción a los 30 días de embriones frescos IVP transferidos (51,4%) fue mayor ($P > 0,05$) que la obtenida
20 con embriones IVP crioconservados por vitrificación (34,6%) y transferencia directa (40,19%). Estos resultados fueron más elevados que los obtenidos por LIM et al. (2008), que transfirieron embriones IVP cultivados en ausencia de FBS y crioconservados por congelación lenta (22,9%) y también más
25 elevados que los embriones IVP crioconservados por

vitrificación con la Técnica de pajuela abierta Halada (Vajta et al., 1998).

Sin desear estar sujetos a ninguna teoría en particular, proponemos que una combinación de cultivo sin FBS más una
5 estrategia de carga para posicionar embriones dentro de dispositivos de pajuela puede ser la razón por la que nuestro protocolo fue exitoso. La tasa de concepción a los 60 días de gestación también se evaluó, con una tasa mayor ($P > 0,05$) en los embriones frescos transferidos (43,2%) en comparación con
10 los resultados fueron similares a los publicados por Hasler et al. (1995), quienes obtuvieron el diseño de tasa 42% de embriones IVP taurus transferidos el día 7 después de la fertilización.

Los hallazgos en este documento demuestran la
15 superioridad de determinadas metodologías de transferencia directa (por ejemplo, congelación lenta), en comparación con la vitrificación tal como se realiza en este documento. En algunas modalidades de la presente invención, puede ser deseable preparar un banco de embriones (por ejemplo, usando
20 tecnologías de transferencia directa/congelación lenta), por ejemplo, que se puede mantener en una primera ubicación (por ejemplo, cuando se produce). En algunas modalidades, la transferencia de tales embriones mantenidos puede resultar más práctica que el uso de tecnologías de vitrificación.

25 En algunas modalidades, las tecnologías descritas en este

documento utilizan semen separado por sexo; en general, se considera que el IVP es el método que permite el uso más eficiente del semen separado por sexo, particularmente valioso en la producción lechera.

5 En algunas modalidades, se pueden emplear una o más variaciones o mejoras, por ejemplo, para reducir las tasas de pérdida embrionaria temprana observadas en determinados estudios descritos en la presente (por ejemplo, cuando se comparan preñeces a 30 y 60 días).

10 Entre otras cosas, la presente descripción proporciona logros y avances en la obtención de preñeces por intermedio de la crioconservación de embriones IVP. Concluimos que los embriones producidos *in vitro* taurus-indicus pueden proporcionar tasas de preñez de aproximadamente el 40% después
15 de la crioconservación mediante métodos de vitrificación o congelación lenta/transferencia directa. Las personas capacitadas en la técnica, al leer la presente descripción, comprenderán que gracias a la aplicación de sus enseñanzas a diferentes contextos (por ejemplo, diferentes razas,
20 diferentes especies, diferentes subespecies, diferentes cruces y/o diferentes híbridos, etc.) puede preverse razonablemente que logrará tasas de preñez de al menos aproximadamente el 10%,
aproximadamente el 11%, aproximadamente el 12%,
aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%,
25 aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%,

aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, o aproximadamente el 50%, en cada caso materialmente más elevado que los normalmente observados (por ejemplo, aproximadamente el 9%) con las tecnologías actuales.

5 Cabe mencionar particularmente que las tecnologías descritas en la presente, al mejorar y/o habilitar (por ejemplo, por el hecho de permitir el logro de tasas de preñez de al menos el 30%) muestran estrategias efectivas de congelación lenta/transferencia, representan un paso
10 importante para que la producción *in vitro* de embriones tenga un uso biotecnológico más amplio en el ganado vacuno.

Equivalentes

Las personas capacitadas en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando solamente una
15 experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita en el presente documento. Los alcances de la presente invención no están destinados a limitarse a la descripción anterior, sino que se establece en las siguientes reivindicaciones.

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un método caracterizado porque comprende las etapas de:

5 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%.

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*;
15 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.

20 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:

25 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.

5 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 O₂ y CO₂.

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 CO₂ y humedad saturada.
10

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 CO₂ en aire y humedad saturada.
15

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 O₂.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de crioconservación de embriones comprende las etapas de:
20

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

sumergir los embriones en nitrógeno líquido.

25 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
5 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
10 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;

15 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
20 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.

25 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
5 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

10 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,
20 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.

25 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

5 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
10 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
15 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:

20 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,
25 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
5 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
10 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,
15 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
20 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
25 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:

5 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:

10 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
15 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
20 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
25 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
5 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:

10 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:

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

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

20 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
25 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
5 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
10 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

15 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
20 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:

25 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:

5 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;

10 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
15 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
20 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
25 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,
5 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
10 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,
15 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
20 transferir el cuerno uterino del ungulado receptor.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se describen tecnologías para la crioconservación de
embriones de ungulados para la implantación en hembras
5 receptoras.

10

15

20

25