

39920

3. COPIA

Int. Cl. C12N 15/00 // A01K 67/02 PATENTE DE INVENCION

~~Int. Cl. A01K~~

*Memoria Descriptiva*

*sobre:*

Procedimiento para el trasplante de embriones para aumentar el número de la descendencia de donadores mamíferos femeninos, ungulados, omnívoros y herbívoros.

=====

*Solicitante:* LYNN LAWRENCE AUGSPURGER, de nacionalidad norteamericana, residente en 642 Fairfax, Brimingham. Michigan 48009, EE.UU. de A.

=====

A finales de la década que comenzó en 1890, Walter Heape de Cambridge, Inglaterra, llevó a cabo experimentos relacionados con la transferencia de huevos en animales. Esta investigación ha sido continuada por muchos experimentadores.

L.E.A. Rowson y sus colaboradores de la Unidad de Fisiología y Bioquímica Reproductiva A.R.C., puesto de investigación de animales, Cambridge, Inglaterra, han desarrollado recientemente técnicas para el trasplante de huevos en mamíferos, particularmente en animales de granja. El Veterinary Annual, 1969, Bristol, John Wright & Sons Ltd., contiene un artículo de L.E.A. Rowson, en la pág. 200, titulado "La Reproducción y los Trastornos Reproductivos", donde se contienen sus desarrollos. También se describen las técnicas relacionadas con estos desarrollos en el libro 5 de la serie "La Reproducción en los Mamíferos, "El Control Artificial de la Reproducción" de C.R. Austin y R.V. Short, publicado en Cambridge y en University Press, 1972, capítulos uno y cuatro; y también se pueden consultar el X Simposio Bienal sobre Reproducción Animal de la Sociedad Americana de Zoología, y en la Relación de los Sexos en el Nacimiento: Perspectivas para un control, un Simposio publicado por la Sociedad Americana de Zoología en 1971. También se contienen avances más generales en este campo en Science (U.S.), Nacho (Reino Unido), Journal of Animal Science, Journal of Reproduction and Fertility y en la revista the Biology of Reproduction.

Estas técnicas, tal como han sido desarrolladas y descritas en las referencias mencionadas, emplean gonadotrofinas exógenas para inducir la superovulación en un donador, sustituido a veces por la sincronización del estror del donador y de los posibles receptores, seguido por inseminación artificial del donador, recogida quirúrgica de oocitos después de fertilización, cultivo del embrión durante un breve período de tiempo en medio de cultivo de tejidos comercialmente disponibles, y por último trasplante al útero de un receptor sin

cronizado de uno o más embriones para maduración del feto. Se ha demostrado que los conejos son "receptáculos" temporales apropiados para el embrión antes del trasplante al receptor, lo cual en la actualidad se prefiere realizar quirúrgicamente, y estos receptáculos se han utilizado para transportar embriones de oveja desde Inglaterra a Africa del Sur, dando lugar a un posterior nacimiento de su madre adoptiva.

Según Austin y Short, pp. 30, unas rajadas de ovario de rata, tratadas con glicerol han sido congeladas a  $-79^{\circ}\text{C}$ , descongeladas y transplantadas a los receptores. Se ha informado igualmente de embriones de ratones que sobrevivieron a la congelación a  $-196^{\circ}\text{C}$  descongelación, y trasplante a los receptores, dando origen a fetos vivos normales y a término, o ratones recién nacidos, véase Science (U.S.), Vol. 178, pp. 441, 27 octubre, 1972. Estos avances se refieren tanto a las técnicas como a otras técnicas que se conocen separadamente y que pueden emplearse con utilidad para alcanzar los resultados que aquí se describen. Por ejemplo, es sabido que puede realizarse la vasectomía para obtener machos más provocativos como método para detectar el estro, ya que la monta es una indicación segura que puede ser confirmada por un método de marcas tal como el descrito en la patente de los Estados Unidos nº 3.076.431 del 5 de febrero 1963.

Se cree que las técnicas aquí descritas representan una técnica perfeccionada para aumentar el potencial reproductivo de ganado genéricamente superior, así como otras formas de animales y mamíferos cuando se emplean tal como se indica en los métodos, dispositivos y composiciones que aquí se describen.

Empleando las técnicas descritas, puede pensarse que

5 el trasplante de huevos se convertirá en una práctica común y, que, contrariamente a lo afirmado por C. Polge en el trabajo mencionado anteriormente "Control Artificial de la Reproducción", no pasará mucho tiempo antes de que se utilicen las técnicas descritas de modo similar a la inseminación artificial con el fin de explotar el potencial genético tanto de la hembra como del macho. Estas técnicas pueden también explotar a auténtica capacidad uterina de las hembras ya que el ganado ovino, el ganado bovino y también las mujeres "parecen ser más bien excepcional por el hecho de que la frecuencia de "grandes camadas" derivadas del tratamiento con gonadotrofinas exógenas debe indicar más bien una capacidad uterina fenomenal". (C. Polge, pág. 25).

15 Si bien las técnicas indicadas han sido utilizadas en procedimientos experimentales, utilizan técnicas que no son fácilmente reproductibles en grandes números y sufren otras deficiencias que se superan con los perfeccionamientos que aquí se exponen.

20 Aunque cualquiera experto en la técnica podrá descubrir diversas modificaciones, combinaciones y arreglos de lo expuesto en la presente patente, tanto ahora como en el futuro, sin apartarse por ello del ámbito de las reivindicaciones adjuntas a la presente, se comprenderá que aquí se exponen utilizan materiales disponibles o materiales aquí descritos.

25 Así pues, se incluyen en el objeto de la presente invención procesos para hacer rentable una mayor disponibilidad de material genético deseado.

30 En consecuencia, en la presente patente se exponen técnicas perfeccionadas para el cultivo de tejidos de embrio-

nes; técnicas de congelación para oocitos, procedimientos para predeterminar el sexo del embrión que se trasplanta, el uso y las técnicas de los cuerpos clonales de manera que puedan obtenerse varios embriones del mismo material genético procedente del mismo donador.

5

La sincronización de donador y receptor se hace menos crítica que hasta ahora, permitiendo un mayor plazo de tiempo en el trasplante.

Los muchos perfeccionamientos que se describen a continuación se expondrán en particular más adelante, y por consiguiente todo lo dicho no se pretende que limite las técnicas que se han de describir, ni representan una descripción completa de los perfeccionamientos que siguen.

10

Entre los objetos de estos perfeccionamientos se encuentran unos procesos mejorados para la reproducción clonal de un animal particular. El uso de espermatozoos esterilizados y una solución de pseudo-fertilización se emplea para inducir una reacción en un oocito y se hace que el oocito se haga diploide utilizando el cuerpo polar originalmente contaminado, transferido o por transferencia de núcleo.

15

20

Por separación celular se obtienen otros embriones clonales adicionales.

Los espermatozoos pueden ser pre-sexuados por las diversas técnicas expuestas, y un perfeccionamiento de esta técnica forma parte importante de la presente solicitud.

25

En consecuencia, se procede a continuación a una descripción de las realizaciones preferidas.

El sexo puede determinarse por observación de la monta, que preferentemente, y con mayor seguridad, se realiza por animales machos vasectomizados o gomerizados. Estos to-

30

ros incitados montarán las vacas al comienzo del estro. Los machos vasectomizados con una parte del vas deferens retirada, o con la eliminación del caudidimo, pueden copular. Con la desviación del pene y el prepocio, puede impedirse la copulación y la transmisión consiguiente de enfermedades. Las con sideraciones económicas exigen que los toros en celo sean ro tados mensualmente por lotes de 20 a 30 vacas con el fin de obtener el uso máximo sin perder la fiabilidad.

La monta puede observarse en estabulación cerrada o en la granja por vaqueros entrenados. No obstante, se obtiene una prueba más segura si la vaca es marcada por el toro que la monta. Kamar, Inc. vende el dispositivo descrito en su patente de los Estados Unidos anteriormente citada nº 3.076. 431. Ahora bien, el toro puede también ser dotado de un ca bestro de marcar diseñado y proporcionado para esta finalidad por American Breeders Service, DeForest, Wisconsin.

Un medio preferible para marcar es una aplicación tó pica de grasa o aceite pigmentados a la porción del macho que se pone en contacto con la zona de la cadera exteriormente vi sible de la hembra durante los intentos de monta. Esto puede aplicarse al pecho o al vientre bajo de los toros.

Las marcas efectuadas sobre la hembra montada pueden observarse fácilmente, permitiendo la detección del est ro incluso por personal no entrenado. Es conveniente que la for mulación de la grasa sea inócua en aplicaciones tópicas y re sistentes al lavado por la lluvia, pero que pueda retirarse con agua de jabón o detergentes. Un vehículo conveniente es un aceite al que se le mezcla un pigmento. Es conveniente em plear diversos colores, para poder proporcionar una variación diaria a las marcas con color.

Ejemplos de vehículos convenientes:

	<u>Formulación</u>	<u>Partes/peso</u>
	Acido oléico o aceite de oliva o aceite de cacahuete	50 %
5	Lecitina (soja)	1 %
	Aceite de ricino	24 %
	Pigmento, como sigue:	25 %
	Azul: Cloruro de cobalto.	
	Negro: Negro de carbón.	
10	Amarillo: Cromato cálcico.	
	Blanco: Carbonato cálcico precipitado.	
	Rojizo: Rojo de vitriolo (hematita roja).	
	Rojo: Pigmento rojo Norman.	

15 La formulación anterior responde a los requisitos y será satisfactoria para aplicaciones tópicas proporcionando al mismo tiempo las convenientes variaciones de color.

20 La preparación de los machos "provocadores" puede realizarse por varias técnicas. La mayor dificultad, debido al hecho de que necesita un cirujano hábil, está en la preparación quirúrgica del macho utilizando la desviación del pene y del prepucio, según se describe en *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician*, Abril 1973, pág. 395. Utilizando este procedimiento, se impide la copulación.

25 No obstante, dado que uno de los aspectos más importantes de la presente descripción es la de proporcionar una técnica fácilmente reproducible, prefiero la técnica de resección del epidídimo, particularmente en la especie bovina. La operación se realiza en el toro, poco antes de la pubertad. La operación que se va a describir tiene la ventaja consiguiente de que la misma técnica puede utilizarse en los animales

30

potenciales para el mercado. Los toros crecen mucho más rápidamente que los novillos, y cabe esperar un peso con menor contenido de grasa de hasta un 8 % superior al que puede obtenerse con los novillos.

5 La operación se realiza en posición erecta. Las colas del epidídimo se retiran a través de pequeñas incisiones escrotales ventrales. Se utiliza anestesia local o anestesia epidural fuerte. Los testículos se envían al fondo del escroto. Se hace una incisión de 3 a 5 cm a través de la piel y  
10 de la túnica directamente sobre la cola del epidídimo. Se utiliza presión dorsal sobre los testículos para obligar a pasar la cola del epidídimo a través de la incisión. El ligamento del epidídimo que une la cola del mismo al testículo se corta con unas tijeras y la cola del epidídimo se mantiene en posición gracias al conducto deferente y al cuerpo del epidídimo,  
15 émbos de los cuales pasan dorsalmente por encima del lado del testículo. Se utiliza material de sutura para ligar entre sí el cuerpo del epidídimo y el testículo. La cola del epidídimo se corta con tijeras y se retira. El procedimiento se repite en el testículo del otro lado. Se aplica polvo antibiótico a la herida, que se cierra con suturas o grapas. Esperar 20 días antes de utilizar el toro.

20 El limitado número de aparición del estro en un grupo demuestra puede aumentarse por sincronización. Es útil a este respecto la supresión del estro por medio de gonadotrofinos, particularmente los progestrónos.

25 El acetato de medroxiprogesterona, C-metil-17 acetoxi progesterona (MAP, Upjohn) es una progesterona sintética que ha sido utilizada en una solución etalónica para suprimir el  
30 estro. El acetato de melengestrol (MGA) se vende por la Divi

5 sión Tuco de la Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan 49001 como aditivo en los piensos disponibles para los titulares de solicitudes de alimentos medicados aprobados, y es un progestrógeno sintético que se utiliza para suprimir el estro con el fin de mejorar el aumento de peso y la tasa de conversión de alimentos en las terneras para engorde. No se aprueba para fines de sincronización. Posiblemente se debe a que el MGA produce abortos (Journal of Animal Science, Vol. 30, pp 433) y la tasa de fertilización de huevos es baja mientras que es elevada las anomalías ováricas (resumen 155, Journal of Animal Science, Vol. 35). El MGA ha sido implantado en un implante de poliuretano colocado en una vena proveniente de la oreja o subcutáneamente en la oreja de las terneras. Se han obtenido porcentajes de liberación de 0,4 mg al día.

15 El MGA puede administrarse oralmente, a diario, o incorporarse a una dieta de grano (hasta 4,0 miligramos en 1,82 kg de grano al día). Yo prefiero utilizar 0,4 mg a 1,0 mg en 1,8 kg al día. La cantidad óptima sería de aproximadamente 0,5 mg de dosis oral diaria. Se ha demostrado que dosis orales diarias de 0,5 mg suprimen el estro y permiten su aparición de 2 a 9 días después de la suspensión del tratamiento, (Veterinary Medicine/Small Animal Clinician., Vol. 65, mayo 1970, pp. 491).

25 Utilizando la dosis oral preferida en el grano, después de la retirada el estro ocurrirá de 2 a 11 días después de la suspensión con una media de 4, 5 días ( $\pm$  0,5 días) después de la suspensión. Las terneras y las hembras maduras después del nacimiento deben tener un ciclo normal del estro antes de la medicación.

30 Con el fin de mejorar la tasa de fertilización de hue-

vos y el estro esperado, el día de la retirada se administran de 10 a 20, preferentemente de 15 a 17 mg del esteroide Benzoato de Estradiol (Arapahoe Chemicals, Inc., Boulder, Colorado), por inyección intramuscular. Esto podrá ir seguido por una cantidad similar el día quinto. La primera cantidad puede reducirse siendo satisfactoria en la mayoría de los casos una dosis de 15-17 mg el quinto día. El esteroide puede introducirse oralmente por mezcla en solución etanólica y a continuación introducirse en forma de cápsula salina, o añadirse a la ración de grano.

Si bien la fertilización puede ocurrir durante el primer estro utilizando la técnica anteriormente citada, en el ganado vacuno será preferible esperar hasta el segundo período, en el que podrán mejorarse los porcentajes de concepción.

Preferentemente los animales se inseminan el día 26 o 27 y de nuevo el día 28 si no se emplea un control preciso de la detección del estro y de la ovulación tal como aquí se describe. Después de sincronización, el estro puede detectarse fácilmente utilizando toros "provocadores". Tal como se ha dicho anteriormente esto hace que las hembras queden marcadas al comienzo del estro.

Según se ha dicho anteriormente, muchos mamíferos tienen una capacidad uterina que permiten la maduración de un mayor número de fetos de lo que es normal en las especies. Esto hace especialmente conveniente los nacimientos múltiples o de mellizos. No obstante, se reconoce que la concepción de mellizos es conveniente, pero que muchos embriones son indeseables. En el ganado vacuno, el procedimiento preferido para provocar el nacimiento de mellizos es una dosis al nivel de 5-15 mg de FSH, preferentemente de 7,5 mg a 10 mg en 3,6 ml

de carboximetilcelulosa Na al 1 % (Abbott Laboratories, Chicago, Illinois) administrados por vía intramuscular dos veces al día, durante 5 días, a partir del día 14-16 del ciclo estrual. La supresión del estro durante este período puede ser conveniente y se realiza, como se ha dicho anteriormente, con los progestrónos sintéticos disponibles en Upjohn tal como se ha dicho anteriormente (MAG). Puede obtenerse el FSH-P en viales de 10 cc de aproximadamente 50 mg de unidades de FSH de Armour-Baldwin Laboratories, Omaha, Nebraska. Una quinta parte de un vial proporciona una dosis adecuada. El FSH tiene de a eliminar la tendencia del FMS a producir la indeseable superovulación que puede provocar un número excesivo de oocitos para maduración.

Se sabe que los embarazos múltiples en el ganado vacuno no tiene efectos colaterales perjudiciales cuando se trata de sexos diferentes, ya que incluso un solo macho de una camada producirá por lo general hembras todas ellas (freemartins" en la camada. La obtención de gemelos, sin embargo, da lugar a un aumento en la producción de animales y los efectos colaterales perjudiciales pueden eliminarse utilizando las técnicas de control del sexo que se discute más adelante.

La superovulación puede distinguirse de las técnicas de obtención de gemelos anteriormente mencionadas, por el hecho de que por lo general se produce en la ovulación un mayor número de huevos.

Puede realizarse la reproducción de individuos seleccionados para utilizar más completamente los factores genéticos de las hembras deseadas. Las técnicas de superovulación y trasplante de huevos han sido ya descritas en líneas generales. Más adelante se describirán ciertos perfeccionamientos

en estas técnicas y los pasos preferidos para ellas.

La supresión del estro es conveniente en los mamíferos receptores. De nuevo haremos referencia a la anterior descripción. La vaca o novilla que debe ser superovulada debe tener un ciclo sincronizado con los de los receptores, pero debido a problemas de fertilidad, los huevos no deben recuperarse hasta el segundo estro.

La ovulación múltiple o superovulación puede provocarse por inyección de 1500 a 3000 UI (unidades internacionales) de PMS, de suero de yegua preñada. Para el ganado vacuno se prefieren 2000 UI, mientras que la mitad de la cantidad utilizada para los animales de mayor tamaño es adecuada para los cerdos y ovejas. El suero PMS (Ayerest Laboratories) puede inyectarse el día 16 del ciclo estrual, o entre los días 15 y 18. Una sola inyección de PMS produce desarrollo hiperfoliular, incluso en terneras de 4 a 14 semanas de edad. Debe ir seguida por una inyección intravenosa de 5 a 10 mg de hormona leutinizante NIH-LH 5 días después de la inyección de PMS. La PH puede obtenerse de los Diamond Laboratories, DeMoinés, Iowa (vetrophin), debiendo tener cada vial una actividad de 5 mg de NIH-FSH-S4 y NIH-LH-S1. De 12 a 24 horas más tarde los huevos producidos deben exponerse al semen si se quiere realizar la inseminación en el animal donador.

Se ha mencionado que en vez de suero PMS, se empleen gonadotrofinas pituitarias (FSH) para provocar el genelaje. Dado que estas últimas se disipan muy rápidamente, entre el día 12 y 18 del ciclo estrual, se necesitan inyecciones de 6-14 mg (el más bajo nivel que producirá menos folículos en desarrollo) 2 veces al día durante aproximadamente 5 días, administradas de la forma anteriormente descrita y preferida,

o bien por vía intramuscular en salina fisiológica. Se ha sugerido que es útil el Nilevar (noretalondrona, que ya no fabrica Searle) para impedir el estro durante este período (Journal Animal Science, Vol. 34. 1972, pp. 77), pero no es conveniente, y puede utilizarse una dosis baja de MGA (0,3-0,5 mg) para alcanzar esta finalidad, que parece aumentar el número de folículos. La FSH-P (Armour-Baldwin) es una gonadotrofina pituitaria apropiada, como se ha dicho anteriormente. Puede sustituirse por 10 mg de FSH porcina preparada. Puede utilizarse la hormona leutilizante, por ejemplo NIH-LH-S1 para provocar la liberación al final del período.

Una vez aparecido el estro en el ganado vacuno, debe ser observado cada 4 horas hasta que se detecte el final del estro, debiendo palparse rectalmente los ovarios a intervalos de 4 horas hasta que se detecta la ovulación. Los animales deben ser inseminados, si se realiza interiormente al donador, con semen durante la última parte del estro.

El desarrollo folicular aquí contemplado puede ser aumentado, especialmente cuando se utiliza gonadotrofinas alimentando a los animales con una ración de elevado contenido energético durante el período de desarrollo folicular, 7 a 14 días después del último estro.

Esta ración debe duplicar el peso de la ración de grano normal, proporcionándose el peso adicional de la ración por glucosa y otras fuentes muy energéticas tales como grasa (tocino) y melazas.

Al comienzo de este período, es conveniente también administrar benzoato de estradiol, en la dosis que se describe aquí en otro lugar.

Es muy conveniente obtener huevos de una hembra super-

ovulada entre 8 y 90 horas después de la ovulación. Si los  
huevos han sido inseminados interiormente, el mejor período  
es entre 50 y 80 horas, y preferiblemente entre 70 y 80 ho-  
ras, en cuyo momento los huevos se encuentran principalmente  
5 en las partes más bajas del oviducto antes de la unión ampu-  
lar-ístmica (una contracción que hay antes del útero) y en  
la parte superior de la trompa uterina. Esto produce una  
concentración de los oocitos en esta zona local.

Este período es generalmente aceptable para sujetos  
10 no inseminados, pero los huevos se encontrarán más arriba en  
el oviducto, incluso cerca de las fimbrias. Aquí el mejor  
período es entre 40 y 80 horas, en cuyo momento la mayoría  
de los huevos han llegado a un punto cerca de la unión ampu-  
lar-ístmica.

15 En otros animales, por ejemplo, las cerdas, el trans-  
porte es aún más rápido que lo anteriormente indicado para el  
ganado vacuno.

Dentro de este período puede realizarse una laparoto-  
mía de costado. Los sujetos deben mantenerse en ayunas 24  
20 horas antes de la operación y recibir una inyección intramus-  
cular de aproximadamente 0,5 ml de clorhidrato de propiopro-  
macina (por ejemplo Travet, Abbott Labs 50/mg ml) 25 minutos  
antes de la anestesia. La anestesia puede ser una inyección  
de clorhidrato de procaina en ámbos lados dorsal y ventral de  
25 las vértebras, primera, tercera y quinta lumbares, siendo la  
cantidad de 100 a 150 ml según el tamaño individual.

La zona de la incisión se afeita y se lava con solu-  
ción aséptica. Puede hacerse una incisión de 15 a 20 cm de  
longitud entre la última costilla y el ángulo externo del  
30 ilio. Esto puede realizarse utilizando una cuchilla Bard-Par

ker nº 22 en un mango Bard-Parker nº 4. Utilizando un triturador se realiza una ovariectomía y salpingectomía bilateral donde se disecciona un oviducto se grapa el extremo cervical de la trompa uterina y se cauteriza con un hierro caliente, y el lugar cauterizado se pincha con una aguja roma de una jeringa de 20-50 ml. conteniendo suero de sangre bovina estéril (Difco, Detroit, Michigan) o preferentemente, cuando se retira el oviducto TCM199 o, más convenientemente, el medio descrito y dado como ejemplo en la presente memoria para cultivo del embrión. La trompa se inunda con suero (podrá necesitar de 20 a 40 ml de suero) y el material se recoge en un vidrio transparente estéril, después de pasar a través del oviducto. Posteriormente se introduce en el oviducto un tubo que tenga una cámara de equilibrio de recogida para recoger los oocitos liberados. La aspiración del túbulo ayudará a este proceso.

La anestesia optativa incluye una inyección inicial de pentobarbitona sodio seguida a los 15 minutos por un circuito cerrado de fluotano y oxígeno. La incisión puede hacerse inmediatamente anterior a la pelvis en la línea media a través de la cual se retiran el útero y los ovarios sujetando con pinzas la trompa. Se efectúa una incisión en la mitad del oviducto a través de la cual se introduce la tubulación. Se introduce una jeringa de 40 ml por encima de la pinza y el oviducto se inunda de la forma anteriormente descrita. Posteriormente se vuelve el útero al abdomen y se sutura la herida utilizando catgut nº 3 seguido por suturas interrumpidas de la piel cubiertas con cinta.

Los huevos fertilizados pueden transferirse a una madre adoptiva receptora cuyo estro esté sincronizado con una variación  $\pm$  2 días.

Los trasplantes utilizan la misma técnica anterior, excepto que el ovario que contiene el corpus luteum se identifica por palpación rectal y los huevos se transfieren a la trampa uterina adyacente utilizando una Pipeta Pasteur conectada a una jeringa de 1 ml. Si el corpus luteum está presente en cada ovario, los huevos pueden trasplantarse a ambas trampas. No obstante, al menos hasta ahora, no es tan fácil el gemelaje. Siempre que puedan sexuarse los huevos (blastómeros) es conveniente trasplantar los huevos para aumentar la probabilidad de parto, pero esto puede hacerse sin demasiado temor a las "freemartins", ya que es más probable un nacimiento por cada dos oocitos.

Si están fertilizados, los huevos pueden mantenerse durante un breve período de tiempo (10 horas) en una cámara de diálisis, o durante más tiempo en una unidad de incubación que se describirá más adelante o bien pueden transferirse a la unión útero-tubárica del oviducto de una coneja que esté ligado, de manera que los huevos no pasen al útero. Esto facilita su recuperación cuando se inunda el oviducto para recuperar los huevos. En estas condiciones, los huevos se dividirán normalmente en unos 7 días, como también puede ocurrir en una incubadora.

Debe llevarse atención para asegurarse de que el receptor esté sincronizado en  $\pm$  2 días, si es posible con toda exactitud. Generalmente se tarda 4 días después de la fertilización antes de que los huevos entren en el útero, donde pueden ser recogidos de la entrada de la cervix por los dos procedimientos que se expondrán. Debemos también recordar que se tarda aproximadamente el mismo tiempo cuando los huevos se recuperan quirúrgicamente del oviducto y del útero. Los recepto

res deben recibir los huevos antes de la regresión del corpus luteum, y preferentemente dentro del periodo que termina el 6º ó 7º día.

5 Utilizando una pipeta, y técnicas como las utilizadas para inseminación artificial, los huevos pueden introducirse a través de la cervix en el ganado vacuno y en los caballos (no en los cerdos) pero deben observarse condiciones asépticas para impedir una endometritis purulenta. La distensión del útero con dióxido de carbono es conveniente para transfe-  
10 rencias no quirúrgicas.

La introducción no quirúrgica de los huevos en los receptores, 2 ó 3 de 6 células en la fase precoz de la mórula, se realiza comenzando por extraer los huevos junto con 0,5 ml de medio o suero en una pipeta ordinaria de inseminación cur-  
15 vada por un extremo, todo ello en condiciones asépticas. La pipeta se introduce a través de un speculum estéril en el canal cervical del receptor y se hace pasar hacia adelante a lo largo de la tromba uterina en la que se ha detectado previamente, por palpación rectal, el corpus luteum. Se introduce CO<sub>2</sub>  
20 a través de la misma pipeta hasta que el útero está totalmente distendido. El equipo incluye dos frascos, uno conteniendo trozos de hielo seco, cubiertos con etanol el cual se conecta al segundo frasco por debajo de una línea de agua (el segundo frasco está lleno hasta la mitad con agua destilada). El es-  
25 pacio superior del segundo frasco se conecta a un adaptador de T, uno de cuyos lados lleva la pipeta y el otro a un balón de goma que se hincha a medida que aumenta la presión en el interior del útero. Inmediatamente después del paso del gas se extrae la pipeta y el útero permanecerá distendido durante  
30 4 a 6 horas.

El trasplante por estas técnicas no quirúrgicas contempla el uso de una cánula flexible hecha preferentemente con tubo Silastic (TM de Dow Chemical) en una pipeta. La pipeta se introduce en la trompa uterina y la cánula se hace pasar (a través de la pipeta) para expulsar el trasplante al interior de la trompa uterina, o con trasplantes de tamaño pequeño, en el interior del oviducto a través de la unión istmica.

Antes de la transferencia de huevos fertilizados al receptor, será conveniente sexuar el embrión que se transfiere. Todo esto puede realizarse de una serie de maneras. Evidentemente, la fertilización del oocito con espermatozoos ordinarios dará lugar a una probabilidad del 50 % de cada sexo. No obstante, ya que se puede mantener el embrión in vitro durante un período de tiempo, tal como se describirá, es también posible determinar microscópicamente con microscopio electrónico, si en las células del embrión están presente los cromosomas X ó Y.

Las células de la fase de mórula o el blastocisto se cortan del embrión. Con el blastocisto, que es más conveniente en vista del menor riesgo de daño, la zona pellucida se mantiene con una pipeta bajo succión y el trofoblasto se penetra con una aguja suficientemente grande como para cortar una o dos células.

Con el fin de examinar el contenido de cromosomas de las células, 0,075 KCl (Gibco nº R15-0575) se mezcla hasta un volumen total de 4 ml y se refrigera. Las células se suspenden en 0,5 ml de suero fetal de ternera y se añaden 0,5 ml de solución hipotónica, seguido por 3,5 ml inmediatamente antes de la centrifugación. Centrifugar durante 6 minutos a 750

r.p.m. El tiempo transcurrido desde la adición hasta la terminación puede ser superior a 12 minutos. Retirar la totalidad a excepción de 0,25 ml de sobrenadante y volver a suspender las células en el sobrenadante restante. Fijar con tres partes de alcohol absoluto por una parte de ácido acético glacial añadiendo primero 0,5 ml, siguiendo por 3,5 ml de solución de fijación. Las células deberán permanecer en la solución de fijación 15 minutos. Retirar todo excepto 0,25 ml de sobrenadante de fijación y repetir el procedimiento de fijación.

Una vez repetido el procedimiento de fijación, retirar la totalidad menos 0,5 ml de solución de fijación y volver a suspender las células. Colocar dos gotas con las células en una platina de vidrio húmeda fría y limpia, y soplar hasta que se seque. A continuación colorear con dos gotas de colorante Aceto-Orcin (Gibco nº 537.538.539). Acto seguido examinar las células con microscopio electrónico y tomar nota de las características de los cromosomas.

Los animales sacrificados pueden ser una fuente de oocitos que pueden transferirse a los receptores vivos para maduración. Los animales sacrificados se tratan antes del sacrificio como si se fuera a adoptar procedimientos quirúrgicos o no quirúrgicos normales. El tiempo de sacrificio debe corresponder al que se expone para las técnicas quirúrgicas. El animal puede ser sacrificado después de fertilización o antes de inseminación como en las técnicas de recuperación quirúrgicas.

El sacrificio se realiza aturdiendo al animal y por sangría. Mientras se realiza la sangría, se efectúa una incisión ventral y se recuperan intactos los ovarios, oviductos y

las trompas uterinas. Las trompas uterinas se sujetan inmediatamente con pinzas y se cauterizan. Los órganos se colocan en un incubador de transferencia para mantenerlos a 30-38 °C y preferentemente a 31-33 °C, transfiriéndose al punto en el que deben recuperarse los huevos.

5

La recuperación se realiza cortando el oviducto y los huevos se sacan del oviducto con la introducción de una jeringa a través de la trompa uterina y la inyección de 20-40 de suero, o, preferentemente, medio de cultivo de tejidos (TCM199 ó Ham's F10 ó F12 Gibco).

10

Los huevos se depositan en un cristal de observación y se cubren con aceite de parafina. Se examinan con un aumento de 50X y se recogen y transfieren al medio de cultivo de tejido preferido que aquí se describe y posteriormente al receptor.

15

Los oocitos no fertilizados pueden recuperarse también del ovario por aspiración del corpus luteum del animal sacrificado. Pueden fertilizarse como se describe en otro lugar.

Entre la recuperación y transferencia a un receptor es conveniente cultivar el embrión en medio de cultivo de tejidos tal como TCM199 ó Ham's F10, y preferentemente en las formulaciones que aquí se describen a título de ejemplo. El cultivo se mantiene en incubador comercial para cultivos de tejidos a temperaturas de 31 a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire u oxígeno. Se prefieren las temperaturas más bajas de la gama (31-33 °C). Puede tenerse algún éxito en la gama normal de cultivo de tejidos de 37 °C.

20

25

Las cámaras de cultivo pueden ser tubos de ensayo de cristal (de 30 mm o de 25 por 75 mm) con tapones de caucho silicónico. La superficie interior del tubo debe recubrirse

30

con silicona para impedir que los organismos se fijen a la pared de vidrio. La mitad del tubo se llena con medio de cultivo tamponado con tampón HEPES, y suero bovino al 20 %, y la otra mitad con la mezcla de gas que se renueva cada 8 horas. Los tubos deben colocarse horizontalmente sobre rodillos y girarse continuamente a 30-40 r.p.m. durante la incubación.

Cuando se recuperan los huevos, se recogen los lavados en los tubos, Se retira alrededor de 3 ml de fluido en el fondo de cada tubo después de 20 minutos a las temperaturas de incubación, transfiriéndose a un cristal de observación o a una platina de pozo, observándose los huevos bajo microscopio de disección a 50 o 187,5X de aumento, y se examinan a 450 o 1875X de aumento.

Los huevos pueden transferirse a los receptores de la forma que se describe o a un cultivo de mayor duración en tubos o conejos.

El medio de cultivo preferido, según se indica en el ejemplo siguiente, incluye Vitamina B12, Lipoicacida, piruvato sódico y L-Glutamina. Se tampona con tampón HEPES y  $\text{NaHCO}_3$  hasta un pH de 3,7-7,4.

<u>EJEMPLO PREFERIDO DE MEDIO DE CULTIVO</u>	<u>mg/litro</u>
NaCl	6.800
Kcl	400
$\text{MgSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	200
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	60
Glucosa	1.800
Rojo fenol	10
CaCl (anhidro)	200
$\text{NaHCO}_3$ (según el pH)	400

		<u>mg/litro</u>
	L-Arginina HCl	70,0
	L-Histidina HCl	20,0
	Monoclorhidrato de L-lisina	70,0
5	DL-triptofano	20,0
	DL-Fenilalanina	50,0
	DL-Metionina	30,0
	DL-Serina	50,0
	DL-Treonina	60,0
10	DL-Leucina	120,0
	DL-Isoleucina	40,0
	DL-Valina	50,0
	DL-monohidrato del ácido glutámico	150,0
	DL-ácido aspártico	60,0
15	DL-Prolina	40,0
	L-Hidroxiprolina	10,0
	Glicina	50,0
	L-Glutamina	100,0
	Acetato sódico	50,0
20	L-cistina	20,0
	L-Tirosina	40,0
	L-cisteina HCl	0,1
	Sulfato de adenina	10,0
	Guanina HCl	0,3
25	Xantina	0,3
	Hipoxantina	0,3
	Uracil	0,3
	Timina	0,3
	Fosfato alfa-tocoferol disódico	0,01
30	Tiamina HCl	0,01

		<u>mg/litro</u>
	Piridoxina HCl	0,025
	Riboflavina	0,010
	Piridoxal HCl	0,025
5	Niacina	0,025
	Pantotenato cálcico	0,010
	i-Inositol	0,050
	Acido ascórbico	0,050
	Acido fólico	0,010
10.	Acido para-aminobenzoico	0,050
	Nitrato férrico Fe (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0,100
	d-Biotina	0,010
	Medaion	0,010
	Glutaion	0,050
15	Vitamina A	0,100
	Calciferol	0,200
	Tween 80 (Trademark Atlas Powder) (marca registrada de Atlas Powder).	20,0
	Acido adenílico	0,200
20	Trifosfato de adenosina	1,0
	Desoxirribose	0,5
	Ribosa	0,5
	Colina Cl	0,5
	Vitamina B12	1,3
25	Acido lipoico	0,2
	Piruvato sódico	110,0
	L-glutamina	200,0

Más 20 % de suero fetal de ternera, inactivado por calor, por litro del ejemplo anterior.

EJEMPLO 2

Igual que el anterior, pero las sales de Earle (Gibco) se sustituyen por las sales del primer ejemplo mientras que la Glucosa sigue siendo de 1800 mg/l.

5

EJEMPLO 3

Igual que el ejemplo 2, con el doble de vitaminas y aminoácidos en peso.

EJEMPLO 4

10

Igual que el ejemplo primero, con el doble en peso de vitaminas y aminoácidos y con glucosa a 1.000 mg/l.

15

Los oocitos pueden retirarse del corpus luteum y madurarse in vitro. Se fija una aguja nº 20 a una jeringa de 100 ml llena con 20 ml de medio de cultivo. El corpus luteum se identifica por la paroscopia realizada a 32-36 horas después de inyección de gonadotrofina para provocar el desarrollo folicular o en las 24 primeras horas de calor o estro en el ganado, preferentemente de que hayan transcurrido 14 horas después de la detección.

20

Se realiza una incisión de 15-20 cm según se describe para recuperación quirúrgica de los huevos o bien en la parte ventral media por encima de la ubre en el ganado vacuno. La cavidad abdominal se distiende con CO<sub>2</sub> y se introduce labroscopio para localizar los ovarios y el corpus luteum. Se penetra en el corpus luteum con la aguja y se aspiran los oocitos bajo vacío firme.

25

30

El oocito se transfiere a un cristal de observación con 5 ml de medio cubierto con parafina o aceite mineral. Las células cumulus que rodean el oocito se retiran con exposición a hyaluronidasa durante 3 a 5 minutos. El oocito se retira con una pipeta y 0,1 ml de medio y se lava 2 veces con 2 ml

de medio. Debe llevarse cuidado para asegurarse de que los oocitos quedan siempre cubiertos con medio o medio PBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) para impedir su deshidratación.

5 Los oocitos aspirados del folículo madurarán in vitro cuando haya sido iniciado el desarrollo folicular por inyecciones de gonadotrofina tal como se utiliza para provocar la super ovulación retirándose los oocitos de las paredes de los folículos finos (desarrollados).

10 Los oocitos madurarán cuando se recuperan del corpus luteum de los folículos maduros en unas 4 horas, cuando se separan las células cumulus. Generalmente no es preciso separar los cumulus cophorus.

15 Los oocitos pueden obtenerse por sacrificio de 6 a 14 horas después de la detección del estro. Los oviductos se separan en secciones de 1/8 de pulgada y debe aspirarse también el corpus luteum no abierto. Las secciones y los oocitos aspirados del corpus luteum deben colocarse en un medio cubierto con aceite de parafina o aceite mineral.

20 Siempre que se recuperen los oocitos deben mantenerse templados en una incubadora o en una platina calentada de un microscopio de disección. El aceite de parafina debe equilibrarse con CO<sub>2</sub> al 5 % en aire en el medio de cultivo.

25 Si es necesario, debe retirarse el coágulo de células cumulus.

30 Debe cuidarse de retener una cantidad de fluido folicular fresco ya que se introduce 0,1 ml de fluido folicular con 0,4 ml de esperma con una concentración de 1 a 2 millones por ml. En un plazo de dos a cuatro horas las células cumulus que rodean los oocitos separan y forman una capa en la superfi

cie. Al cabo de 5 a 7 horas de concentración, la fertilización ha terminado y los huevos pueden colocarse en cultivo para su maduración hasta la fase mórula o transferirse a un receptor.

5 La fertilización in vitro utiliza los ejemplos de formulación del medio de cultivo tamponado a un pH 7,3-7,5 con bicarbonato sódico y HCl diluido. El piruvato sódico o el oxaloacetato sódico deben formar parte de este medio de fertilización así como albúmina bovina al 30 % del volumen utilizado. El medio para fertilización y cultivo debe contener 10 50 miligramos de sulfato de estreptomycin/ml y 75 mg de penicilina G (sal potásica) ml. No obstante, estos últimos preparados deben utilizarse cuando se utiliza la separación del esperma por sexo.

15 La sincronización del donador y el receptor así como el tiempo de ovulación pueden eliminarse empleando técnicas perfeccionadas.

Puede obtenerse un retraso por cultivo de los cuerpos celulares trasplantados durante un cierto período de tiempo.

20 Esto puede conseguirse por las técnicas de congelación que aquí se describen, o provocando el desarrollo de la célula del donador por separación de la célula de manera que el número total de células diferenciadas que se trasplantan se encuentren en la fase en la que estarían si se hubiese permitido el progreso normal.

25 Así, se prefiere trasplantar los cuerpos celulares a receptores en el momento correspondiente a unos pocos días desde el momento de la división de la primera célula o los cuerpos celulares y el tiempo de fertilización normal del receptor. El objeto es el de proporcionar la célula del donador.

30

dor al receptor en un momento aproximadamente igual al que permite la implantación en la fase de desarrollo del blastocisto.

5 Se trata preferentemente de 12 días de sincronización de la fase esperada de blastocisto o mórula del embrión y la fecha en que el receptor puede esperar su propia fase de blastocisto o mórula.

10 Esta temporización permite un mayor uso del trasplante no quirúrgico, así como trasplantes quirúrgicos en un tiempo posterior, y debe realizarse antes del décimo día después de la ovulación del receptor, preferentemente antes del 7º día después de la ovulación.

15 Las técnicas de separación de células y las técnicas de congelación que se utilizan para alcanzar este resultado se exponen aquí en otro lugar.

La determinación del sexo es importante por muchas razones, y puede obtenerse por sexualización de un embrión después de fertilización o de otras de las maneras que aquí se describen.

20 Los espermatozoos pueden pre-sexualizarse por separación de los cromosomas X e Y que llevan espermatozoos, utilizándose la separación resultante para fertilizar los oocitos maduros.

25 Un procedimiento para conseguir la separación es por centrifugación repetida a 750 r.p.m. de pipetas cerradas que contienen semen. El esperma "femenino" pesa ligeramente más y tiende a concentrarse en la parte inferior del tubo. Los espermatozoos deben suspenderse en una solución tamponada clara durante la centrifugación. Se ha utilizado también la electroforesis para separar los espermatozoos. Ninguna de es

30

tes técnicas son particularmente satisfactorias en el estado actual de la técnica.

5 No obstante, puede emplearse una técnica perfeccionada que utiliza materiales de intercambio de iones tal como se describe en esta patente. Se reconoce que los espermatozoos tienen una carga negativa, pero parece que hay una localización de la carga en la cabeza o en la cola de los espermatozoos. Se observa la posibilidad de obtener mejores resultados para obtener los espermatozoos femeninos deseados utilizando 10 materiales de intercambios de iones, bien separadamente o bien en combinación con la centrifugación.

Se utilizan cationes para producir el atrapamiento del esperma "masculino" y aniones para atrapar los espermatozoos "femeninos". Esto puede realizarse induciendo una floculación del esperma indeseado en un cristal de observación con una elevada superficie en relación con el volúmen, describiéndose más adelante el procedimiento preferido. 15

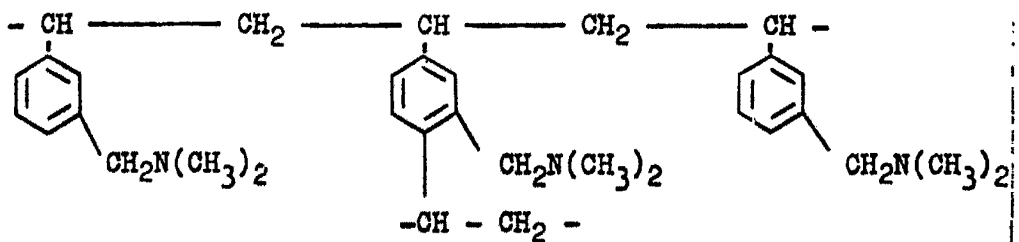
Si bien se reconoce que pueden utilizarse como materiales de intercambio de iones las arenas glauconíticas y las zeolitas, los resultados más satisfactorios se obtienen dividiendo finamente resinas de intercambios de iones. Son apropiadas las resinas catiónicas de los copolímeros divinilo carboxílico/benceno o los productos de la copolimerización del ácido metacrílico con divinilbenceno y los del anhídrido maléico con estireno y con divinil-benceno. No se utiliza estreptomycin en el medio de soporte con resinas carboxílicas debido a su intercambio de iones con ellas. Estas resinas catiónicas producirán espermatozoos capaces de producir embriones femeninos 20 25

30 Los intercambiadores aniónicos pueden producirse por

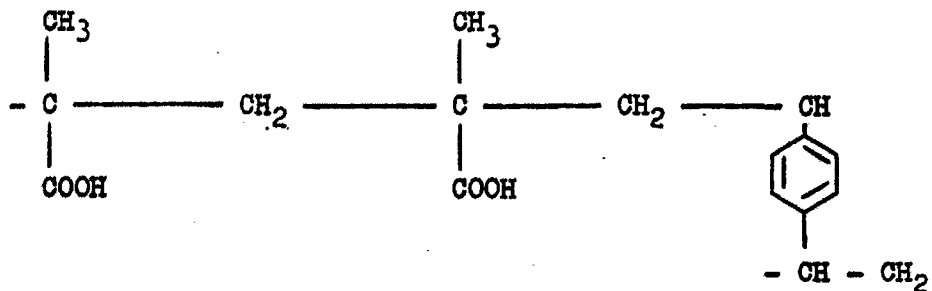
nitración y reducción posterior de copolímeros de estireno/divinilbenceno. Con este sistema se producirán espermatozoos capaces de producir embriones machos.

Las resinas resultantes tienen las estructuras siguientes:

Resina básica de intercambio de aniones



Resina ácida de intercambio de cationes.



Las resinas que se utilizan pueden basarse en las resinas Dowex (marca registrada de la Dow Chemical Company, Midland Michigan). Pueden utilizarse las resinas aniónicas más fuertemente básicas del tipo de estireno-divinilbenceno, Dowex, 1,221K, pero es mejor utilizar la poliamina de poliestireno Dowex 3, que es débilmente básica, en un medio con una gama de pH hasta 7,1-7,3. Se prefiere un tamaño de malla de 100 o superior (100-300). Las resinas apropiadas son las B342-AG3, B343-AG3 (ambas poliaminas de poliestireno) y B143-AG1, B144-AG1 (amonio cuaternario de poliestireno) como

25

30

aniones y las B544-AG50, B545-AG50 (basadas en la Dowex 50) como cationes, que pueden obtenerse de los Bio-Rad Laboratories, Richmond, California.

5 Las resinas del tipo aniónico y catiónico pueden ser del tipo de celulosa, prefiriéndose el tipo catiónico. Puede utilizarse un intercambiador de malla 100 a 200 del tipo 20 CM-celulosa (carboximetilcelulosa) de la Brown Company, 555 Fifth Ave., Nueva York, Nueva York.

10 Para obtener la muestra, el semen se lava dos veces y se soporta en una solución tampón con un pH de 7,3-7,5. La resina se introduce en un tubo de ensayo con un extremo inferior en embudo y un borde ampliado, el cual se apoya a su vez dentro de un tubo de ensayo de recogida. El esperma se introduce por encima de la resina y se filtra a través de la resina, preferentemente por centrifugación a 750 r.p.m. durante  
15 un minuto o más. La base del tubo exterior de recogida tiene una solución tampón adicional de soporte para recoger el esperma separado.

20 El esperma se estratifica a continuación, y los espermatozoos deseados se retiran y se utilizan para inseminación o bien se congelan.

Otra técnica que puede utilizarse sola o en combinación con los citados materiales de intercambio de iones para separación de las fracciones espermáticas es una combinación  
25 de centrifugación y diferencias de presión.

Esta técnica es especialmente efectiva con el ganado vacuno debido a la gran diferencia de tamaño de los espermatozoos X e Y. Se utiliza una cámara de separación de tubo cónico de una centrífuga a contracorriente. La fracción femenina deseada se obtiene colocando semen lavado y diluido en  
30

la centrífuga, solo o junto con el intercambiador de iones apropiado, y la solución diluida se centrifuga a 750 r.p.m. a una velocidad menor de 1000 r.p.m. A continuación se aplica una segunda o tercera fuerza, es decir, la aplicación de una diferencia de presión de 15-30 cm de aquella en la que se obtiene el esperma.

Para la selección masculina se aplican las citadas técnicas, aumentándose la velocidad a más de 1000 r.p.m. y a menos de 1200 r.p.m. Se aplica un vacío del orden de 15-30 cm como diferencia de presión en comparación con la de la presión de recuperación del esperma.

Las fracciones se obtienen de este modo y se retiran del diluyente, concentrándose a continuación. Pueden utilizarse entonces para inseminación o congelarse en una solución tampón para uso posterior.

La realización preferida utiliza centrifugación e contracorriente en combinación con un material de intercambio de iones. Si bien la diferencia de presión parece mejorar los resultados, pueden obtenerse fracciones satisfactorias tal como se describe en otro lugar. Estas fracciones se utilizan para inseminar los huevos recobrados.

El sexo puede determinarse por examen de las células retiradas de un embrión. En la fase del blastocisto, el embrión se coloca en una cámara en la platina calentada de un microscopio de disección del tipo de contraste de fase. La zona pellicuda se mantiene con una micropipeta bajo un ligero vacío. Las células se retiran colocando una segunda micropipeta contra la zona pellicuda con una ligera presión en la región del trofoblasto, y se inserta una aguja capilar en las células, retirándose del trofoblasto unas pocas células.

Estas pueden examinarse entonces con un microscopio electrónico para determinar el sexo.

Cuando ha sido determinado el sexo, el blastocisto puede transferirse a un receptor y dejarse madurar.

5 En las células del embrión pueden realizarse diferentes operaciones que ayudan a la reproducción de animales genéticamente superiores por parte de los receptores, igual que se hace con los sexos. Esto abre la posibilidad de utilizar más plenamente la capacidad uterina del ganado vacuno, evitando las terneras "freemartins" y es aplicable a otras especies.

10 Los huevos fertilizados y los pequeños embriones, preferentemente de tamaño no mayor que la fase mórula pueden congelarse a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Esto se realiza lavando los embriones en 2 ml de medio, según se describe aquí por ejemplo o con solución PBS. A los huevos recuperados del corpus luteum se les podrá retirar células cumulus extrañas del folículo de De Graaf exponiéndolas a hyaluronidasa (150 unidades U.S.P. por mililitro) en el medio durante 3 a 5 minutos.

15 En una gota muy pequeña (aproximadamente 0,01 ml) de medio, los huevos se transfieren a pipetas que contienen 0,1 ml de medio. La refrigeración se realiza en un baño a una velocidad inferior a  $2^{\circ}\text{C}$  por minuto con un punto óptimo entre  $0,3$  y  $0,4^{\circ}\text{C}$  por minuto. A  $0^{\circ}\text{C}$ , se añade como tampón 0,1 ml de dimetilsulfóxido 2M. Después de 15 o más minutos, las muestras se transfieren a un baño de aproximadamente  $-4^{\circ}\text{C}$  y se siembran dos minutos más tarde con un cristal de hielo diminuto. Las muestras se enfrían entonces a la misma velocidad hasta  $-70^{\circ}\text{C}$  y a continuación a  $-110^{\circ}\text{C}$  (etanol y baño de hielos seco) y acto seguido se transfieren directamente al ni-

20

25

30

trógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Puede utilizarse helio líquido para obtener el gradiente de temperatura y la velocidad de enfriamiento.

5 La descongelación se realiza colocando la pipeta en un tubo de 40 x 200 mm en  $-110^{\circ}\text{C}$  de etanol y calentándose por contacto con aire a temperatura ambiente a  $4^{\circ}$  por minuto, midiéndose a partir de  $-65^{\circ}\text{C}$ . A  $0^{\circ}\text{C}$  se añaden 0,2, a continuación 0,2 y finalmente 0,4 ml del medio de cultivo. Los embriones se transfieren entonces a un ml de medio y se enjuagan dos veces con una cantidad similar. Se examina a 50X para determinar la velocidad de recuperación y se transfiere al cultivo, es decir, a un cristal de observación bajo aceite mineral a  $30-38^{\circ}\text{C}$ . (Preferentemente  $31-33^{\circ}\text{C}$ ) en una atmósfera con 5 % de  $\text{CO}_2$  y oxígeno o aire.

15 Los cuerpos celulares que se congelan de este modo deben congelarse en el medio preferido según la presente memoria conteniendo piruvato sódico u oxaloacetato sódico en cantidades iguales. También puede utilizarse una solución PBS conteniendo estas sustancias, siendo conveniente la adición de glucosa.

20 Es importante aumentar la utilización de los huevos recuperados u congelar en el mismo recipiente embriones del mismo sexo.

25 Con esta finalidad conviene separar las células individuales de un huevo con una lisina, tal como aquí se describe, y colocar células del mismo tipo en el mismo recipiente.

Las células separadas con lisina son perfectamente capaces de diferenciación después de descongelación y se obtienen mejores resultados en el proceso de descongelación.

30 La zona pellicuda de la fase de mórula o el cuerpo ce-

lular embriónico inferior, incluyendo las que se separan por tratamiento con lisina, pueden retirarse convenientemente antes de la congelación.

5 Después de la descongelación los cuerpos celulares pueden protegerse por transferencia a la zona pellicuda de una segunda célula.

Estos procedimientos se definen con mayor detalle en otro lugar.

10 Las oosferas pueden congelarse de la manera anteriormente mencionada y descongelarse hasta 0°C, añadiéndose gotas sucesivas de esperma, preferentemente con fluido folicular, tal como se describe más adelante, mezclado con el medio de soporte, hasta que la cantidad de medio de soporte fluido sea de aproximadamente 0,8 a 1 ml dejándose calentar el medio por  
15 exposición a la temperatura ambiente durante 3 horas. Para una descripción más detallada de la fertilización in vitro puede consultarse el ejemplo dado sin referencia a la congelación.

20 Las operaciones en las células, mórulas y blastocistos se realizan con ayuda de un microscopio de disección de contraste de fase. El soporte de células empleado es un pequeño cristal de observación en forma de copa que ha sido cubierto y tiene unas aberturas de acceso de pequeño tamaño en sus lados a través de las cuales pueden introducirse las herramientas de operación. Estos orificios y la chapa de recubrimiento  
25 se sellan con película de aceite de silicona, y las herramientas pueden mantenerse con microposicionadores e introducirse a través de la película de aceite. La platina del microscopio debe estar calentada.

30 Las microagujas pueden hacerse con vidrio Pyrex de 1 mm

(marca registrada de Corning Glass) o con varilla de vidrio de borosilice estiradas hasta formar un eje delgado (de unos 0,3 mm) y de 50 mm de longitud. Se hace un codo vertical para proporcionar separación entre el soporte de la microherramienta y la platina del microscopio. El eje fino se dispone en un gancho para soportar un peso, y a continuación el eje con el gancho se carga con una carga de 1 g y se estira en un ángulo de  $45^{\circ}$ . En la punta se dispone un cordón que a continuación se lava o para una aguja de gancho la punta se enfría ligeramente y a continuación se dobla a un ángulo de aproximadamente  $120^{\circ}$  como para formar una aguja de gancho con un ángulo incluido de aproximadamente  $60^{\circ}$ .

Las micropipetas se hacen como las agujas comenzando con capilares de vidrio de 1 mm. Entre las operaciones de estirado se forma un gancho en la pipeta, y finalmente se estira también la pipeta hasta una porción muy fina con una carga de 250 mg en un ángulo de  $45^{\circ}$ . El orificio se dispone en la superficie para formar un orificio de cordón biselado. Pueden utilizarse microposicionadores comerciales (Leitz) para mantener las herramientas en las operaciones que se realizan dentro de las células con las herramientas así preparadas sostenidas por los microposicionadores.

En la fase bicelular antes de la división, las células deben ser observadas íntimamente para comprobar la división a la fase de 4 células. En la fase de 4 células, los cuadrantes superior e inferior del mismo hemisferio de la fase de 4 células pueden separarse micro-quirúrgicamente pasando mecánicamente una microaguja de vidrio a través de la zona pellicuda (si no se ha retirado previamente con lisina) y a continuación separando los dos hemisferios con presión baja y sos-

tenida. Este procedimiento puede utilizarse para producir gemelos idénticos.

5 Es posible la clonización de un huevo fertilizado. La técnica que se utiliza aquí es la de retirar la zona pellicu-  
da en la fase de mórula del desarrollo o en la fase de 8 a 16  
células por tripsinación. Las células se suspenden en el cal-  
do y se exponen a la solución de tripsina y a los 15 minutos  
se agitan mecánicamente con una microaguja de vidrio para se-  
parar las células individuales. Las células se lavan rápida-  
mente con medio tamponado con fosfato.

10 Al mismo tiempo es conveniente disponer de otros hue-  
vos de donatario adicionales con la zona pellicuda intacta.  
Con una aguja estéril, bajo el microscopio, se retiran o deg-  
truyen los núcleos de cada célula del donatario. Las célu-  
15 las del donador se aspiran al interior de una aguja fijada a  
una jeringa y la célula se inyecta en la región nuclear de  
las células del donatario, y posteriormente estas células del  
donatario se transfieren al cultivo o al recipiente para su  
maduración. Normalmente las células se observan a través de  
20 la primera división después de la inyección y antes de la  
transferencia.

La zona pellicuda puede retirarse con tripsina, disa-  
sociándose las células por tripsinación u otra tripsina.

25 Las células pueden suspenderse en el medio preferido  
o en un medio básico de Eagle, ambos modificados de manera  
que tengan el doble de la cantidad habitual de aminoácidos y  
vitaminas (80 partes /volumen), caldo de fosfato de triptosa  
(10 partes/volumen) y albúmina de suero bovino (10 partes/vo-  
lumen) en un disco Petri plano de 112 ml con 20 ml de medio  
30 bajo parafina o aceite mineral. A continuación se añade al

medio una solución al 0,5 % de acetato sódico en una solución al 1 % de tripsina. Las células deben incubarse durante 15-30 minutos hasta que se retira la zona pellicuda.

5 La disociación de las células después de retirada la zona pellicuda puede realizarse con una onza cristalizada de tripsina al 0,1 % (Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey) en solución PBS (salina tamponada con fosfato con sales de Eagles) pipetándose suavemente después de 15-30 minutos. Se puede utilizar 0,01 ml de PBS con 0,005 de solución de tripsina. Puede ayudarse a la separación por agitación o con cualquier otra ayuda mecánica, como por ejemplo introduciendo una aguja fina en la masa celular y agitando.

10 Después de separación con tripsina u otra lisina, se llena una jeringa estéril con aproximadamente 0,1 ml de medio retirándose las células y lavándose dos veces con solución limpia para eliminar la tripsina. Una o más de las células pueden sexuarse con ayuda de un microscopio electrónico.

15 Si se desea probar la repetición del tipo de clonización anterior, debe permitirse a las células crecer de nuevo hasta la fase de mórula en cultivo, colocándose las células en 2-4 ml de medio de cultivo en un disco de Petri de cultivo de tejidos de plástico y 32 mm que se sitúa en un disco mayor que contiene 1,0 ml de solución PBS y se obtura fuertemente en bolsas de plástico hasta que alcance un mayor tamaño.

20 No obstante, debe entenderse que cada proceso repetido aumenta notablemente la posibilidad de que se desarrollen embriones incompletos.

25 Es posible obtener el desarrollo de las células separadas sin la zona pellicuda, pero la zona pellicuda actúa como protección natural dentro del recipiente y de esta manera se  
30

obtiene más fácilmente la supervivencia hasta la maduración. Como se ha indicado anteriormente, esto se consigue por transferencia de la célula del donador a una célula del donatario. Esto se realiza aspirando la célula e inyectándola en una célula de donatario que tiene su zona pellicuda intacta y el núcleo destruido. Esto se consigue de diversas maneras que se describen a continuación.

Bajo un microscopio de disección se mantiene con una pipeta un oocito. Se penetra en la zona pellicuda con una aguja de gancho y el núcleo se saca de la célula o se destruye con agitación. A continuación se implanta en esta región la célula del donador. El núcleo puede obtenerse también provocando la extrusión de los cromosomas de la célula si una célula es capaz de división. Durante la metafase, se coloca una pequeña gota de aceite de silicona junto a la célula, y la célula extruirá los cromosomas en el aceite de donde pueden retirarse. No obstante, se prefiere la retirada mecánica del protoplasma nuclear, y puede acudirse al uso de la división de células en interfase o del oocito. También se puede retirar el núcleo con una aguja capilar por aspiración. Si se utilizan agujas finas se evita la deformación celular provocada por las agujas más gruesas.

Otra técnica para la transferencia de cuerpos celulares de un embrión es la de retirar la célula de la zona pellicuda por aplicación de lisina o bien quirúrgicamente. A continuación las células retiradas se transplantan a una nueva zona pellicuda y se deja desarrollar en la misma. El núcleo de la célula original puede destruirse por enucleación, destrucción del núcleo, o por excisión, si así se prefiere.

Estas técnicas o sus combinaciones pueden emplearse

para retrasar el tiempo del trasplante necesario y conseguir más cuerpos clonales.

5 Las células pueden trasplantarse enteras o bien sólo el núcleo y el citoplasma circundante en el nuevo organismo celular. Si se utiliza este último sistema, es necesario enuclear la célula receptora y transferir el núcleo y citoplasma circundante al citoplasma de la célula huésped.

10 Si bien la célula anteriormente descrita es simple y cómoda, también se pueden emplear otras técnicas alternativas. La zona pellicuda de la célula del donador puede permanecer intacta, retirándose las células del bastómetro o mórula y transferirse de la forma anteriormente mencionada a una célula del donatario. Las células pueden extraerse como células completas y se obtienen buenos resultados. No obstante, también es posible extraer el mismo núcleo y transferirlo a la célula del donatario. La temporización de esta última técnica es más crítica, ya que tanto el núcleo como la célula donataria muestra una tendencia a desintegrarse, y la transferencia debe realizarse efectuándose ambas operaciones en paralelo en un tiempo muy breve.

15 Estas técnicas producen "gemelos" idénticos, que no son del mismo material genético que el padre o la madre, con teniendo genes de ambos, ya que las características genéticas se determinan por fertilización antes de separación de las células embriónicas.

25 Puede ser especialmente conveniente obtener descendencia femenina con el mismo material genético que el animal madre.

30 Se han creado ya nuevos individuos en los animales inferiores sin fertilización por espermatozoos. Se han ferti-

zados huevos de pava con virus, produciendo pavos machos.

Según las dos técnicas que se describen a continuación, se puede utilizar también el contenido cromosómico de sólo la hembra.

5 Se emplean dos oocitos. Cada oocito es un oocito secundario que tiene alienado un solo cuerpo polar y ha llegado a la metafase mitótica de la segunda división, como ocurre en el momento de la ovulación.

10 Tanto el cuerpo polar como el pronúcleo son haploides. Los dos oocitos se colocan en una cámara cerrada de disección en la platina calentada de un microscopio de disección de contraste de fase. Se controla cuidadosamente la presión dentro de la cámara. El medio de soporte debe fortalecerse con glucosa y en la proporción en peso que se describe en el ejemplo I. El medio de soporte puede ser el mismo utilizado para tripsinización, añadiéndose una cantidad igual de hyaluronidasa y tripsina. Se hace una punción en la célula del donatario y se observa la formación de gránulos cortical en la membrana vitelina. A los 5-10 minutos, el pronúcleo del segundo oocito tripsinizado ha alcanzado su desarrollo necesario y se retira e inyecta en el primer oocito del donatario. A continuación se añaden al medio del soporte cantidades iguales de Androgamone III, un ácido graso, un sulfato dodecil-sódico y veneno de abejas. Con un porcentaje igual en peso de tripsina, hyaluronidase y la Androgamone III, sulfato dodecil-sódico y veneno de abeja, se obtiene en cierta medida una pseudo fertilización de la célula del donatario.

25 Como sustituto, puede prepararse una suspensión lavada y densa de espermatozoides en la solución de tripsina, centrifugándose a elevada velocidad. El sobrenadante contendrá

30

un extracto que se coloca en lugar de la misma cantidad en peso de los ácidos grasos y detergentes y en el mismo momento del proceso.

5 El cuerpo polar puede ser sustituido por el pronúcleo del segundo oocito en una segunda realización.

Cuando se observa la metafase, el resultado de la unión de los dos cuerpos haploides se han fundido para formar el cigoto diploide y el sexo del embrión se determina por los cromosomas obtenidos únicamente del animal madre.

10 Cuando se ha observado que la célula tiene la reacción violeta característica de la fertilización, se retira el cigoto diploide, se lava y se transfiere al medio de cultivo.

A continuación se observa la célula para determinar si ocurre una división normal y posteriormente puede ser manejada como si la célula fuese el resultado de una fertilización normal.

15 Los espermatozoides estériles vivos son capaces de iniciar la pseudo-fertilización. Estos espermatozoides se obtienen sometiendo los espermatozoides normales a luz ultravioleta. La cantidad de exposición es variable, y depende de las especies, la proximidad de la fuente luminosa y el tiempo de exposición. Una exposición excesiva matará los espermatozoides. El tiempo preferido de exposición varía ampliamente, ya que de 30 segundos a 3 minutos han producido resultados satisfactorios.

20 Estos espermatozoides estériles irradiados con luz ultravioleta (o esterilizados de cualquier otra forma como por ejemplo por exposición a irradiación como se hace con los programas del control de las moscas) pueden iniciar el desarrollo de la telofase.

25

30

La expulsión del cuerpo polar daría como resultado normalmente un cuerpo haploide, que mientras progresan las divisiones, no madurará.

Además de los procedimientos anteriormente citados para proporcionar un cuerpo haploide adicional, pueden utilizarse otros enfoques alternativos para producir el diploide deseado.

Si bien la temperatura normal de desarrollo del oocito en el ganado vacuno es de 100 a 102,5°F, los oocitos pueden recogerse y mantenerse a una temperatura inferior.

El ganado vacuno, el porcino y el caballo producen huevos que pueden cultivarse a 37°C o, como se ha dicho anteriormente, se obtienen mejores resultados a temperaturas aún menores en la gama de 30 a 34°C y preferentemente de 31 a 33°C.

A estas temperaturas puede obtenerse la pseudo fertilización por el proceso anteriormente mencionado. Esto debe realizarse bajo microscopio de manera que pueda observarse el desarrollo de los huevos "fertilizados". Cuando se observa que el segundo cuerpo polar se dirige hacia la expulsión a través de la membrana vitelina, pero antes de que ocurra dicha expulsión, debe someterse al huevo a choque térmico de aproximadamente 10°C colocando el porta-objeto de cultivo en un baño maría a temperatura superior. Esto eleva la temperatura por encima de la temperatura normal pero por debajo de la temperatura a la que moriría la célula.

Si bien el rendimiento es bastante bajo, se ha observado que ciertamente se obtienen cuerpos diploides normales. Estos se dividen en el curso normal y pueden trasplantarse para desarrollo ulterior. Las células pueden cultivarse y obtenerse

se cuerpos clonales adicionales por separación celular del embrión, como se ha expuesto anteriormente.

El rendimiento puede mejorarse implantando el núcleo obtenido de otro huevo del mismo animal, como se ha dicho antes. Puede utilizarse el choque térmico en unión con este tratamiento. Esta técnica puede combinarse con el uso de es-  
5 perma estéril para producir cuerpos celulares clonales.

Otro ejemplo de esperma preseleccionado que puede utilizarse en la fertilización de un oocito emplea la mencionada  
10 técnica de separación, preferentemente a través de una resina de intercambio de cationes, y con un medio que contiene un 20-40 % de albúmina, preferentemente albúmina bovina (Grand Island Biological Company). Aquí deben utilizarse las mencio-  
nadas resinas de intercambio de cationes. El esperma resul-  
15 tante comprenderá un mayor porcentaje de esperma productor de organismos femeninos.

En la práctica, cuando se intenta obtener cuerpos clo-  
nales del genotipo del donador, el uso de esperma presexuado  
pero estéril puede asegurar un mayor rendimiento de cuerpos  
20 transplantables ya que los mismos espermatozoides no estéri-  
les pueden ser eficaces para provocar una auténtica fertiliza-  
ción, y el resultado, aunque no sea un genotipo del donador,  
se podrá utilizar como cuerpo de trasplante.

- NOTA -

25 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el in-  
30 vento, corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en

Norteamérica, con fecha 23 de noviembre de 1.973, bajo el número 418.604, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA EL TRASPLANTE DE EMBRIONES PARA AUMENTAR EL NUMERO DE LA DESCENDENCIA DE DONADORES MAMIFEROS FEMENINOS, UNGULADOS, OMNIVOROS Y HERBIVOROS; caracterizándose se por lo siguiente:

1ª.- Procedimiento para el trasplante de embriones para aumentar el número de la descendencia de donadores mamíferos femeninos ungulados, omnívoros y herbívoros, caracterizado porque comprende las etapas de: a) inducir una superovulación en un donador deseado administrando gonadotrofina; b) recuperar los huevos del donador; c) colocar los huevos recuperados en medio de cultivo de tejidos y almacenar los huevos recuperados durante un cierto período de tiempo; d) preparar los receptores de posibles trasplantes y determinar el tiempo de ovulación de los receptores; e) seleccionar uno o más de los cuerpos celulares o huevo individual de dichos huevos almacenados en el citado medio de cultivo; y f) trasplantar un huevo individual seleccionado o cuerpos celulares obtenidos de dicho donador a un receptor seleccionado en un momento que corresponda con una sincronización del huevo individual o cuerpos celulares trasplantados y el tiempo de fertilización normal del receptor de manera que el trasplante esté sincronizado en la fase del blastocisto en el receptor en el momento en que este último implantaría normalmente un blastocisto, si el receptor hubiese sido fertilizado.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracte-

terizado porque los huevos se congelan como medio de cultivo de tejidos antes del trasplante.

5 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los huevos recuperados del donador tienen células separadas del huevo individual y por consiguiente se retrasa el desarrollo a la fase del blastocisto.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el trasplante se hace en la trompa uterina del receptor.

10 5ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el trasplante se hace en el oviducto del receptor.

15 6ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el trasplante se hace en el oviducto del receptor a través de la trompa uterina y por medio de una cánula insertada a través de la unión istmica.

20 7ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se permite al huevo la diferenciación en una serie de cuerpos celulares no desarrollados más allá de la fase del blastocisto, y se recuperan una o más células diferenciadas para examen microscópico con el que poder determinar el sexo.

25 8ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se administra al donador de huevos una hormona luteinizante de 4 a 6 días después de la administración de gonadotrofina.

9ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se alimenta al donador con una ración de alta energía durante el período de desarrollo folicular.

30 10ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracte-

rizado porque antes del trasplante se insertan unos cuerpos celulares del donador dentro de la zona pellicuda de una célula embriónica adoptiva.

5 11ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque antes del trasplante a un receptor, los cuerpos celulares en desarrollo se cultivan a una temperatura de 30 a 38°C.

10 12ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los cuerpos celulares se cultivan en un medio que contiene solución salina, glucosa, amino ácidos, vitaminas y piruvato sódico.

13ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de soporte de la vida está de acuerdo con los ejemplos preferidos que aquí se indican.

15 14ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los cuerpos celulares se congelan y se descongelan antes del trasplante.

20 15ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende las etapas de: inducir la superovulación en un donador deseado por administración de gonadotrofina para obtener una serie de huevos en ovulación, recuperar los huevos del donador, seleccionar un huevo de los huevos recuperados y dividirlo en una serie de células embrionicas separadas, de manera que cada una esté dividida en una serie de cuerpos celulares embrionicos separados derivados del  
25 huevo seleccionado entre los huevos que han sido recuperados, y trasplantar uno o más de los cuerpos celulares derivados del huevo seleccionado a una hembra adoptiva receptora para su maduración.

30 16ª.- Procedimiento según la reivindicación 15, caracte-

terizado porque los huevos del donador se fertilizan con una fracción de espermatozoides en los que la mayoría producirá cigotos de un sexo deseado.

5 17<sup>o</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque los cuerpos celulares se sexuan antes del trasplante a un receptor, recibiendo sólo el receptor trasplante de igual sexo.

10 18<sup>o</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los huevos se recuperan después de sacrificio del donador.

19<sup>o</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque los huevos recuperados se fertilizan in vitro.

15 20<sup>o</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el trasplante se realiza sin operación quirúrgica.

20 21<sup>o</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para el trasplante de embrión a mamíferos unguladores, herbívoros y omnívoros, comprende las etapas de: suprimir el estro por administración de progesterona a un posible receptor durante un cierto período de tiempo; suspender la progesterona; administrar posteriormente gonadotrofina para fomentar el desarrollo folicular; administrar hormona luteinizante al posible receptor durante 4 a  
25 6 días después de la administración de gonadotrofina; y trasplantar un embrión a dicho receptor de 12 a 48 horas después de la administración de dicha hormona luteinizante o de la detección del estro.

30 22<sup>o</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado porque incluye además la administración de estradiol

al receptor al mismo tiempo que se retira la progesterona, o después de la retirada.

23<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 22, caracterizado porque el estradiol es benzoato de estradiol.

5 24<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado porque la progesterona es C-metil-17 acetoxi-progesterona.

10 25<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado porque la progesterona se administra en una dosis oral diaria de 0,4 a 1,0 mg.

26<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado porque la gonadotrofina se administra después de suspender la progesterona y después de que haya ocurrido un estro intermedio, y en el día 14-20 posterior.

15 27<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para la separación de espermatozoides para producir una fracción que contenga espermatozoides de un carácter sexual predeterminado comprende las etapas de: lavar el esperma y transferir los espermatozoides a una solución de soporte de fluido diluido; filtrar los espermatozoides a través de un material de intercambio de iones; concentrar el producto y transferir el producto deseado a una solución tamponada.

20

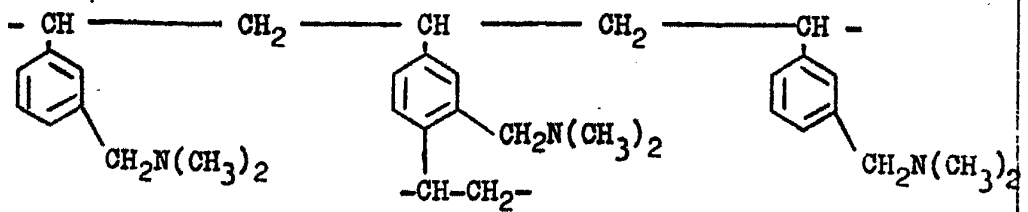
25 28<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 27, caracterizado porque el material de intercambio de iones es un material de intercambio de cationes.

30 29<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 27, caracterizado porque el material de intercambio de cationes es una resina del grupo formado por: copolímeros carboxílico/divinilbenceno, los productos de la copolimerización del ácido meta-

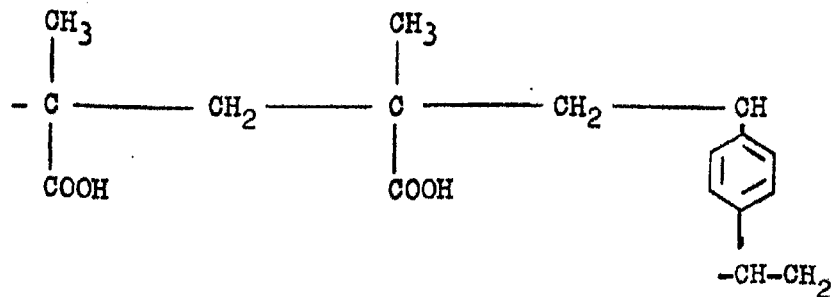
crílico con el divinil-benceno, y los productos del anhídrido maléico con esterino y divinil-benceno.

5 30<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 27, caracterizado porque el material de intercambio de iones es una resina catiónica y el fluido diluido se filtra a través de la resina, utilizándose la fracción inferior para proporcionar la fracción de espermatozoides concentrados.

10 31<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 27, caracterizado porque el material de intercambio de iones es una resina que tiene la estructura



20 32<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 27, caracterizado porque el material de intercambio de iones es una resina que tiene la estructura



33<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 27, caracterizado porque la filtración se lleva a cabo bajo vacío de una diferencia de presión de 15 a 30 cm.

30 34<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 27, caracterizado porque la filtración se lleva a cabo bajo presión.

35ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para la separación de la fracción deseada de espermatozoides comprende las etapas de: lavar y diluir los espermatozoides recuperados de un donador; colocar la solución diluida conteniendo espermatozoides en una centrifuga a contracorriente y centrifugar durante un período superior a 20 minutos; durante la centrifugación, exponer los espermatozoides a una segunda fuerza; suspender la centrifugación y retirar del diluyente la fracción deseada.

36ª.- Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado porque la segunda fuerza es una diferencia de presión en relación con la presión a la que se recuperaron los espermatozoides.

37ª.- Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado porque la centrifugación se hace a una velocidad inferior a 1000 r.p.m.

38ª.- Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado porque la centrifugación se hace a velocidad superior a 1000 r.p.m. e inferior a 1200 r.p.m.

39ª.- Procedimiento según la reivindicación 36, caracterizado porque la diferencia de presión es de 15 a 30 cm.

40ª.- Procedimiento según la reivindicación 35, caracterizado porque dentro de la centrifuga hay un material de intercambio de iones a través del cual se filtran los espermatozoos.

41ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para el trasplante posterior del embrión a mamíferos ungulados omnívoros y herbívoros comprende las etapas de: transferir un cuerpo celular de la especie trasplantada que no se haya desarrollado más allá de la fase

de fórmula de diferenciación en una gota de medio de soporte vital a una pipeta que contenga aproximadamente una cantidad igual de medio; enfriar el recipiente en un baño de fluido a una velocidad inferior a  $2^{\circ}\text{C}$  por minuto; al llegar a los  $0^{\circ}\text{C}$ ,  
5 añadir una cantidad igual de solución tampón al recipiente; posteriormente enfriar el recipiente a aproximadamente  $-4^{\circ}\text{C}$ , y sembrar el baño del recipiente con un cristal congelado para iniciar una refrigeración ulterior; continuar la refrigeración del recipiente a la misma velocidad, hasta que se alcance una temperatura estable en el fluido del baño.  
10

42\*.- Procedimiento según la reivindicación 41, caracterizado porque la zona pellicuda del cuerpo celular se retira antes de la transferencia del recipiente.

43\*.- Procedimiento según la reivindicación 41, caracterizado porque las células individuales del cuerpo celular se separan con solución de lisina.  
15

44\*.- Procedimiento según la reivindicación 41, caracterizado porque el cuerpo celular es una oosfera que posteriormente se descongela a  $0^{\circ}\text{C}$  mezclándose con el medio de soporte gotas sucesivas de fluido conteniendo esperma, hasta que la cantidad de medio de soporte fluido es de aproximadamente 0,8 a 1 ml, dejándose calentar el medio por exposición del recipiente al aire por un período superior a 3 horas.  
20

45\*.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para preparar un cuerpo celular diferenciado de mamífero ungulado para su trasplante comprende las etapas de: obtener un primero y un segundo cuerpo celular embrionario cada uno de los cuales no se haya desarrollado más allá de la fase del blastocisto; retirar un cuerpo celular capaz de diferenciación del primer cuerpo y transferirlo al se-  
25  
30

gundo cuerpo dentro de la zona pellicuda del mismo; destruir posteriormente el cuerpo celular original del segundo cuerpo para permitir una completa diferenciación del cuerpo transferido dentro de la zona pellicuda del citado segundo cuerpo.

5           46ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para preparar cuerpos celulares diferenciados de mamíferos ungulados comprende las etapas de: obtener un primero y un segundo cuerpo celular embrionario, cada uno de los cuales no se haya desarrollado más allá de la  
10 fase del blastocisto; enuclear el segundo cuerpo celular por destrucción o retirada del núcleo del mismo; retirar al menos una parte del primer cuerpo celular formada por el núcleo y al menos una porción del citoplasma que rodea dicho núcleo y transferir el núcleo y el citoplasma al cuerpo celular enu-  
15 cleado para diferenciación en el mismo.

          47ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para preparar un cuerpo celular derivado clonalmente de mamífero ungulado para su trasplante, comprende las etapas de: obtener un primer cuerpo celular em-  
20 brionario que no se haya desarrollado más allá de la fase del blastocisto; liberar células individuales del cuerpo celular; inyectar una célula individual del primer cuerpo celular a un segundo cuerpo celular en espera dentro de la zona pellicuda del mismo, y transferir el segundo cuerpo celular a un medio  
25 de soporte vital para diferenciación de la célula individual separada del primer cuerpo celular.

          48ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para el trasplante de embrión en ma-  
míferos ungulados omnívoros y herbívoros comprende las etapas  
30 de: preparar uno o más cuerpos celulares para su trasplante,

produciendo con ello un genotipo deseado por los pasos de:

(1) obtener un oocito no fertilizado que se haya desarrollado hasta alcanzar la metafase mitótica a partir de un donador de oocitos seleccionado; (2) Inducir la reacción de fertilización dentro del oocito sin la entrada en el interior del oocito de un genoma derivado del espermatozoo; (3) y provocar el desarrollo de un núcleo diploide completo dentro del oocito, cuyo núcleo consiste en una serie de cromosomas derivada de las células sexuales femeninas del donador de cromosomas, y transferir el oocito a un medio de soporte vital para diferenciación y maduración después del trasplante.

49<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 48, caracterizado porque el oocito se mantiene por debajo de la temperatura corporal y después de que se ha iniciado la inducción de la reacción de fertilización se somete al oocito a un choque térmico atrapando de ese modo un grupo cromosómico que normalmente sería expulsado como cuerpo polar dentro del oocito, como fuente de cromosoma para el núcleo diploide.

50<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 48, caracterizado porque la reacción de fertilización se inicia con espermatozoides esterilizados.

51<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 48, caracterizado porque la reacción de fertilización se inicia con una solución de pseudo-fertilización.

52<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 51, caracterizado porque el oocito es inyectado con un cuerpo haploide derivado del oocito como fuente de cromosomas para el núcleo diploide.

53<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 52, caracterizado porque el cuerpo haploide es un derivado del cuerpo

polar y el cigoto diploide se obtiene del cuerpo polar y del pronúcleo del oocito.

5 54ª.- Procedimiento según la reivindicación 52, caracterizado porque es inyectado al oocito material nuclear derivado de otro oocito no fertilizado.

55ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1, 15, 27, 35, caracterizado porque son seleccionados los espermatozoos haciéndolos pasar a través de una solución que contiene albúmina.

10 56ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para producir nacimientos múltiples en mamíferos herbívoros sin superar la capacidad uterina de los mismos, comprende las etapas de: administrar una ración de elevada energía durante el período de desarrollo folicular, administrando durante el período gonadotrofina pituitaria.

15 57ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para el trasplante de embrión para aumentar el número de la descendencia de donadores mamíferos ungulados hembras, omnívoros y herbívoros comprende las etapas de: guardar los huevos recuperados de un donador en medio de cultivo de tejidos como células de huevos individuales o cuerpos celulares durante un período de tiempo; preparar uno o más receptores de un posible trasplante y determinar el tiempo de ovulación de un receptor seleccionado; seleccionar un huevo o cuerpo celular almacenado del medio de cultivo de tejido de almacenamiento; y, trasplantar el huevo o cuerpo celular seleccionado obtenido del donador al receptor seleccionado en un momento que corresponda a una sincronización del huevo o cuerpo celular individual trasplan

20

25

30

tado y el tiempo de fertilización normal del receptor, de manera que el trasplante se sincronice en la fase de blastocisto del receptor con el momento en el que el receptor implantaría normalmente un blastocisto propio si hubiese sido fertilizado.

5

58<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque los huevos son congelados en un medio de cultivo de tejidos antes del trasplante.

10

59<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque los huevos recuperados del donador tienen células separadas del huevo individual recuperado como cuerpos celulares embriónicos y el desarrollo de cada uno de los cuerpos celulares así separados se retrasa hasta la fase de blastocisto, y posteriormente se trasplanta uno o más de los cuerpos celulares separados a un receptor seleccionado.

15

60<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque el trasplante al receptor ocurre después de que los huevos recuperados hayan sido almacenados durante un período de tiempo superior a una serie de días.

20

61<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque el trasplante al receptor se retrasa durante un período de tiempo superior al tiempo durante el cual el donador hubiese transportado normalmente sus huevos a través de su oviducto hasta la trompa uterina.

25

62<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque el trasplante se efectúa en la trompa uterina del receptor.

30

63<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque el trasplante se efectúa en el oviducto del receptor.

64<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 63, caracterizado porque el trasplante se realiza en el oviducto del receptor a través de la trompa uterina y por medio de una cánula insertada a través de la unión istmica.

5

65<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque se permite al huevo su división en una serie de cuerpos celulares desarrollados no más allá de la fase de blastocisto, y una o más células diferenciadas de un cuerpo celular que se quiere trasplantar o de un cuerpo celular obtenido de uno que debe trasplantarse, se examinan con un microscopio para determinar el sexo del trasplante.

10

66<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque los huevos se recuperan de un donador que ha recibido hormona luteinizante de 4 a 6 días después de la administración de gonadotrofina para provocar la superovulación.

15

67<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque los huevos se recuperan de un donador que ha sido alimentado con una ración de elevada energía durante el período de desarrollo folicular.

20

68<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque antes del trasplante se separan uno o más cuerpos celulares de un solo huevo recuperado del donador y se insertan dentro de la zona pellicuda de una zona embrionica receptora.

25

69<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 68, caracterizado porque los cuerpos celulares separados se separan de otras células del mismo huevo por exposición a una solución de lisina.

30

70<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque el periodo de tiempo para almacenamiento del

huevo recuperado es superior a 2 días.

71<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque la temperatura de almacenamiento del medio de cultivo de tejidos es de 30 a 38<sup>o</sup>C.

5           72<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque el huevo individual o los cuerpos celulares se almacenan y cultivan en un medio que contienen solución salina, glucosa, aminoácidos, vitaminas y piruvato sódico.

10           73<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque el medio de cultivo de tejidos de soporte vital está de acuerdo con los ejemplos preferidos de la presente patente.

15           74<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque los huevos recuperados son obtenidos induciendo una superovulación en un donador deseado por administración de gonadotropina al donador, y posteriormente, después de la ovulación, se recuperan del mismo los huevos.

20           75<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque los huevos del donador son fertilizados con una fracción de espermatozoides cuyo mayor número producirán cigotos de un sexo deseado.

25           76<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque los cuerpos celulares trasplantados o el huevo se sexuan antes del trasplante a un recipiente, recibiendo el recipiente sólo un huevo individual o cuerpos celulares individuales de un sexo seleccionado y del mismo sexo.

          77<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque los huevos se recuperan después de sacrificio del donador.

30           78<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracter-

terizado porque los huevos recuperados se fertilizan in vitro.

5           79ª.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque el trasplante se lleva a cabo sin intervención quirúrgica.

80ª.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque el huevo o cuerpos celulares individuales son de un genotipo clonal, teniendo cada célula embrionica todos sus cromosomas derivados del mismo individuo.

10           81ª.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque el huevo o cuerpo celular trasplantado tiene todos los cromosomas derivados del donador induciendo el desarrollo de un oocito recuperado del donador, de manera que el oocito se forma a partir de un núcleo diploide obtenido

15           de dos genomas del donador.

82ª.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque es administrado al donador de los huevos recuperados una ración de elevada energía durante el período de desarrollo folicular y al mismo tiempo se ha administrado

20           gonadotrofina pituitaria, recuperándose posteriormente los huevos.

83ª.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque se preparan uno o más receptores para un futuro trasplante mediante la supresión del estro en los receptores por administración de progesterona durante un cierto

25           período de tiempo, retirada de la progesterona, administración posterior de gonadotrofina para fomentar el desarrollo folicular en los receptores, administración de hormona luteinizante a los futuros receptores de 4 a 6 días después de la

30           administración de gonadotrofina, y por último realización del

trasplante en los receptores de 12 a 48 horas después de la administración de la hormona luteinizante o de la detección del estro correspondiente al tiempo de fertilización normal del receptor.

5           84<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque la preparación de los receptores incluye la supresión del estro en los receptores y a continuación la suspensión de la supresión del estro mientras que al mismo tiempo o posteriormente se administra estradiol al receptor.

10           85<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque es administrado benzoato de estradiol a los receptores antes de llevar a cabo la fase del trasplante.

15           86<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque es administrado C-metil-17-acetoxi-progesterona a una serie de posibles receptores para suprimir el estro y permitir la sincronización de los receptores y su período de ovulación con el tiempo del trasplante deseado.

20           87<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque durante el periodo de preparación de los futuros receptores, se suprime el estro durante un periodo de tiempo por administración de progesterona durante el periodo de supresión a la dosis oral de 0,4 a 1,0 mg al día.

25           88<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque la preparación de los posibles receptores incluye la supresión del estro durante un período de tiempo permitiéndose después que se presente el estro, y después del último período del estro se administra gonadotrofina al posible receptor entre los días 14 al 20.

30           89<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque la fracción de espermatozoos se produce por

un proceso que incluye las etapas de: lavar el esperma recuperado de un donador macho y transferir los espermatozoides a una solución de soporte de fluido diluido; filtrar los espermatozoides a través de un material de intercambio de iones; y concentrar el producto y transferir el producto concentrado a una solución tamponada.

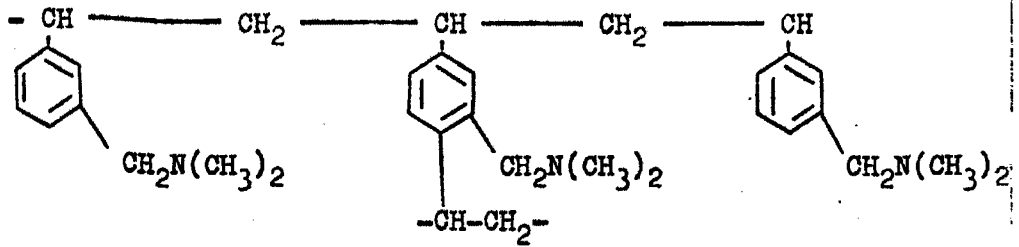
90<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque la fracción de espermatozoides se obtiene filtrando los espermatozoos a través de una resina de intercambio de cationes.

91<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque los espermatozoos se centrifugan a través de una resina de intercambio de iones y se fraccionan por separación, utilizándose la fracción inferior que ha sido separada en la fase de centrifugación.

92<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque la fracción de espermatozoides es obtenida filtrando los espermatozoides a través de un material de intercambio de iones del tipo catiónico, siendo la resina del grupo formado por: copolímeros carboxílicos/divinil-benceno; productos de la copolimerización del ácido metacrílico con el divinil-benceno; y, productos del anhídrido maléico con estireno y divinil-benceno.

93<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque la fracción de espermatozoides se obtiene filtrando los espermatozoides a través de una resina de intercambio de iones que tiene la estructura:

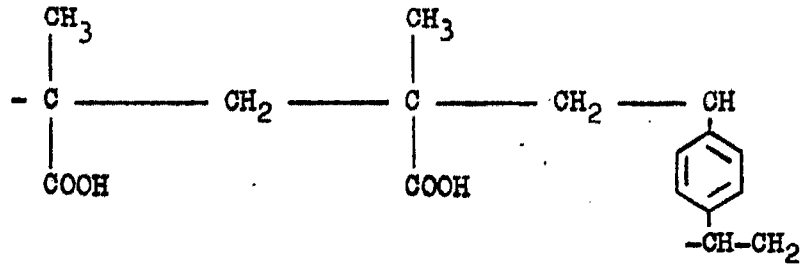
5



10

94<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque la fracción de espermatozoides se obtiene filtrando los espermatozoides a través de una resina de intercambio de iones que tiene la estructura:

15



20

95<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque la fracción de espermatozoides se obtiene por un proceso que incluye someter los espermatozoides a un vacío de 15 a 30 cm de diferencia de presión en relación con la presión a la que se recuperaron los espermatozoides de un donador macho.

25

96<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque la fracción de espermatozoides es obtenida por un proceso que incluye someter los espermatozoides a una presión superior a aquella a la que se recuperaron los espermatozoides de un donador macho.

30

97<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque la fracción de espermatozoides es obtenida por un proceso que incluye, lavar y diluir los espermatozoi-

des recuperados de un donador macho; colocar la solución diluida que contiene espermatozoides en una centrífuga a contracorriente y centrifugar durante un período superior a 20 minutos; suspender la centrifugación y retirar la fracción deseada del diluyente.

5

98<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 96, caracterizado porque durante la centrifugación, es aplicado a los espermatozoos una diferencia de presión en relación con la presión a la que se recuperaron los espermatozoides de un donador macho.

10

99<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 97, caracterizado porque la diferencia de presión es un vacío de 15 a 30 cm.

100<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 96, caracterizado porque dentro de la centrífuga hay una resina de intercambio de iones a través de la cual se filtran los espermatozoides durante la centrifugación.

15

101<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque la fracción de espermatozoides es obtenida por un proceso que incluye someter los espermatozoides a centrifugación a una velocidad inferior a 1000 r.p.m.

20

102<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 75, caracterizado porque la fracción de espermatozoides es obtenida por un proceso que incluye someter los espermatozoides a centrifugación a una velocidad superior a 1000 r.p.m. e inferior a 1200 r.p.m.

25

103<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque cada huevo o cuerpo celular individual que se pretende trasplantar se almacenan durante un período de tiempo por un proceso que incluye, transferir un huevo o cuer

30

po celular individual que se pretende trasplantar se almacenan durante un período de tiempo por un proceso que incluye, transferir un huevo o cuerpo celular individual de los huevos recuperados que no se hayan desarrollado más allá de la fase de mórula de diferenciación en una pequeña cantidad de flúido a un medio de soporte vital y un recipiente para el mismo; en-  
5 friar el recipiente en un baño de flúido a una velocidad inferior a 2°C por minuto; a aproximadamente 0°C añadir una cantidad igual de solución tampón al recipiente; continuar acto  
10 seguido el enfriamiento del recipiente a igual velocidad de enfriamiento hasta que se alcance una temperatura estable de almacenamiento congelado para el huevo o cuerpo celular.

104<sup>s</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 102, caracterizado porque a aproximadamente menos 4°C es sometido al  
15 recipiente a posterior enfriamiento después de sembrar el baño de flúido con un cristal congelado para iniciar un ulterior enfriamiento.

105<sup>s</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 102, caracterizado porque la zona pellicuda del cuerpo celular se re-  
20 tira antes de transferencia al recipiente.

106<sup>s</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 58, caracterizado porque los huevos congelados incluyen una oosfera  
25 que posteriormente se descongela a aproximadamente 0°C y se mezclan gotas sucesivas de flúido conteniendo esperma con el medio de cultivo hasta que la cantidad de medio flúido es de aproximadamente 0,8 a 1 ml, dejándose calentar el medio por  
30 exposición de su recipiente al aire a la temperatura ambiente normal durante un periodo superior a 3 horas.

107<sup>s</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 57, caracterizado porque una serie de cuerpos celulares embríonicos en

desarrollo o huevo se trasplantan a un solo redeptor, determinándose el número que se trasplante por la capacidad uterina del receptor, de manera que no se exceda la capacidad.

5 108<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para aumentar el número de la descendencia de donadores mamíferos unguladores hembras, omnívoros y herbívoros, comprende las etapas de: seleccionar un solo huevo que ha sido recuperado de un donador para su trasplante; separar una o más células de otras células del huevo simple para obtener una serie de cuerpos celulares embrionícos similares pero separados, que se separan y liberan de 10 otras células del huevo simple; seleccionar cuerpos celulares separados individuales que han sido separados y son capaces de diferenciación individual para su trasplante; y trasplantar uno o más de los cuerpos celulares individuales separados 15 y seleccionados que son capaces de ulterior diferenciación y derivados del huevo simple a una hembra receptora para su maduración en la misma.

20 109<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 107, caracterizado porque el huevo seleccionado es fertilizado con una fracción de espermatozoides cuyo mayor número producirá cigotos de un sexo deseado.

25 110<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 107, caracterizado porque los cuerpos celulares se sexuan antes del trasplante a un receptor.

111<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 107, caracterizado porque las células embrionícas individuales son separadas y se liberan de otras células del huevo simple con la ayuda de una solución de lisina.

30 112<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 107, caract

terizado porque el huevo simple es preparado asexualmente de una oosfera recuperada del donador y sus cromosomas son derivados del donador padre antes de que se separen entre si las células embriónicas.

5           113<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 107, caracterizado porque los cuerpos celulares separados trasplantados se insertan dentro de la zona pellicuda de un huevo que está a la espera y al que se ha destruido su material nuclear antes de que se trasplanten a un receptor uno o más de los cuerpos celulares individuales.

10           114<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 107, caracterizado porque los cuerpos celulares separados son protegidos del trasplante inyectando el material nuclear de la célula separada en una célula huésped que ha sido enucleada.

15           115<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 107, caracterizado porque el donador ha sido superovulado y una serie de huevos recuperados del donador y uno o más de los huevos recuperados son procesados.

20           116<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 107, caracterizado porque al receptor se le ha administrado gonadotrofina antes del estro durante el cual se lleva a cabo el trasplante de las células embriónicas del donador.

25           117<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende las etapas de: recuperar un huevo del donador; separar una o más células del huevo después de que ha sido dividido el mismo, pero no diferenciado más allá de la fase de mórula del desarrollo con ayuda de una solución de lisina, dentro de la cual se coloca el huevo, separándose las células individuales de otras células del huevo; con lo que se liberan los cuerpos celulares em

30

5      briónicos individuales que son capaces de diferenciación se-  
parada; inyectar células individuales que han sido así sepa-  
radas en un cuerpo celular correspondiente y que se encuen-  
tra a la espera de manera que el cuerpo celular que se encuen-  
tra a la espera proteja la célula individual inyectada contra  
la destrucción y permita que esta célula individual se desarro-  
lle y diferencie como célula embrionica separada retrasada en  
su desarrollo en comparación con la fase de desarrollo que el  
huevo original habría alcanzado si no se hubiesen separado  
10      del mismo las células individuales; y por último transplantar  
una o más células individuales así separadas, obtenidas del  
único huevo obtenido del donador, a un receptor, en un momen-  
to tal que el receptor se encuentre sincronizado para recibir  
las células trasplantadas de acuerdo con su fase de diferen-  
ciación.

15      118<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones ante-  
riores, caracterizado porque para aumentar el número de la  
descendencia de donadores mamíferos, unguladores hembras, om-  
nívoros y herbívoros comprende las etapas de: seleccionar un  
20      donador deseado; administrar gonadotrofina al donador para  
provocar la superovulación del mismo; detectar el estro en el  
donador, e inseminarlo; recuperar una serie de huevos ferti-  
lizados del donador y almacenarlos en medio de cultivo de te-  
jido a una temperatura entre 30 y 38<sup>o</sup>C; seleccionar una se-  
25      rie de posibles receptores que se calcula que ovularán a apro-  
ximadamente el mismo tiempo, inyectar a los posibles recepto-  
res una hormona luteinizante a aproximadamente el mismo tiem-  
po; seleccionar un huevo almacenado que ha sido sometido a  
varias divisiones y separar varias de las células del huevo  
30      seleccionado y liberarlas entre sí de manera que se proporcio-

ne una serie de células embriónicas capaces de división ulterior, segregando las células separadas en grupos originados del huevo seleccionado; en un plazo de 12 a 48 horas después de la administración de la hormona luteinizante, trasplantar una o más de las células segregadas y separadas obtenidas del huevo almacenado seleccionado a un receptor seleccionado, en un momento que corresponde a una sincronización del período de 12 a 48 horas después de administración de la hormona y a un período de 12 a 48 horas de desarrollo de cada célula individual separada que se trasplantará después de la separación y de manera que el trasplante esté sincronizado en la fase de blastocisto del receptor en el momento en el que el receptor hubiera implantado normalmente un blastocisto propio; y repetir el trasplante para otras células de la misma manera.

119\*.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende las etapas de: provocar superovulación en un donador deseado; detectar el estro en el donador; inseminar al donador; recuperar los huevos fertilizados del donador inundando el oviducto o el útero del donador que contiene los huevos y recuperando los huevos así inundados del donador y colocando los huevos recuperados en un medio de soporte vital; después de recuperación de los huevos del donador, retrasar el desarrollo a través de diferenciación de los huevos por un proceso de retraso; incluyendo el proceso de retraso una fase de congelación de 1 o más huevos embriónicos recuperados con una pequeña cantidad de medio de soporte vital disponible en un recipiente, enfriar el recipiente en un baño de fluido a una velocidad inferior a  $2^{\circ}\text{C}$  por minuto y añadir al recipiente, a aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$ , una cantidad igual de solución tampón, continuando acto seguido la

refrigeración del recipiente a una temperatura inferior a 0°C, que es una temperatura estable de almacenamiento; detectar el estro en un posible receptor; seleccionar un huevo almacenado de los huevos congelados almacenados y descongelar el huevo almacenado que ha sido seleccionado, y trasplantar dicho huevo seleccionado al posible receptor en un momento correspondiente a una sincronización del huevo seleccionado y el tiempo de fertilización del receptor, de forma que el trasplante se sincronice en la fase de blastocisto en el recipiente en el momento en que este último implantaría normalmente un blastocisto propio.

120<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende las etapas de: provocar superovulación en un donador deseado; detectar el estro en el donador; inseminar dicho donador; recuperar los huevos fertilizados del donador inundando el oviducto o el útero del donador que contiene dichos huevos y recuperando los huevos así inundados del donador y colocando los huevos recuperados en un medio de soporte vital; después de recuperación de los huevos del donador, retrasar el desarrollo a través de diferenciación de los huevos por un proceso de retraso; incluyendo dicho proceso de retraso una fase de selección de un huevo de dichos huevos recuperados y separar una o más células de dicho huevo después de que el mismo ha sido dividido pero no diferenciado más allá de la fase de mórula del desarrollo con ayuda de una solución de lisina en la cual se coloca el huevo, y las células individuales se separan de otras células del huevo seleccionado, liberando con ello cuerpos celulares embriónicos individuales que son capaces de diferenciación separada; y almacenar dichos cuerpos celulares en medio de

5 cultivo de tejidos durante un período de tiempo; detectar el estro en un posible receptor; seleccionar un cuerpo celular almacenado del medio de cultivo, y trasplantar el cuerpo celular seleccionado al receptor posible en un momento correspondiente a una sincronización del cuerpo celular seleccionado en su fase de desarrollo y el tiempo de fertilización del receptor, de manera que el trasplante esté sincronizado en la fase del blastocisto del receptor en el momento en el que el receptor normalmente implantaría un blastocisto propio.

10 121<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende las etapas de: provocar superovulación en un donador deseado; detectar el estro en el donador; inseminar al donador; recuperar los huevos fertilizados del donador inundando el oviducto o el útero del donador que contiene los huevos y recuperando los huevos así inundados del donador y colocando los huevos recuperados en un medio de soporte vital; determinar el sexo de cada uno de los huevos recuperados por examen microscópico de una o más células de cada huevo; a continuación retardar el desarrollo de los huevos recuperados por un proceso de retraso y almacenar los huevos recuperados y retardados en un medio de soporte vital durante un cierto período de tiempo; detectar el estro en un posible receptor; seleccionar un huevo almacenado o una serie de huevos almacenados de los huevos almacenados mencionados, siendo todos los huevos seleccionados del mismo sexo; y trasplantar los huevos seleccionados a la serie de huevos seleccionados de igual sexo al citado posible receptor, en un tiempo que corresponda a una sincronización del huevo seleccionado y el tiempo de fertilización del receptor de ma-

15

20

25

30

nera que el trasplante se sincronice en la fase de blastocisto del receptor en el momento en el que el receptor implantaría normalmente un blastocisto propio.

5           122ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende las etapas de: inducir la superovulación en un donador deseado; detectar el estro en el donador; inseminar dicho donador con espermatozoides procedentes de una fracción de espermatozoides, cuyo mayor número producirá cigotos de un sexo deseado; recuperar huevos fertilizados de dicho donador inundando con fluido dichos huevos del oviducto o útero del donador, y retirando los huevos inundados del donador, colocando los huevos recuperados en un medio de soporte vital; examinar una o más células de los huevos recuperados para determinar el sexo de las células del huevo del que se han extraído las células que se examinan, y separar los huevos embrionarios de acuerdo con su sexo; someter dichos huevos recuperados a un proceso de retraso que retrasa el desarrollo normal del huevo y almacenar los huevos recuperados durante un cierto período de tiempo; detectar el estro en un posible receptor; seleccionar uno o más huevos almacenados de igual sexo del almacenamiento, y trasplantar el huevo seleccionado al posible receptor en un momento en el que el trasplante se sincronice en la fase de blastocisto del receptor en el momento en el que el receptor implantaría normalmente un blastocisto propio.

10

15

20

25

30           123ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende las etapas de: inducir superovulación en un donador deseado; detectar el estro en el donador; inseminar el donador; recuperar huevos fertilizados del donador por inundación con fluido de los huevos del oviduc

to o útero del donador, retirando los huevos así inundados y colocando los huevos recuperados en un medio de soporte vital; examinar una o más células de los huevos recuperados para determinar el sexo de las células del huevo de donde se derivan las células que se examinan, y separar los huevos embrionicos de acuerdo con su sexo; someter los huevos recuperados a un proceso de retraso que retarda el desarrollo normal de los huevos y permite un almacenamiento prolongado de los huevos recuperados, incluyendo el proceso de retraso una fase de congelación de uno o más huevos embrionicos recuperados con una pequeña cantidad de medio de soporte vital disponible en un recipiente, enfriar el recipiente en un baño de fluido a una velocidad inferior a 2°C por minuto y añadir a dicho recipiente, a aproximadamente 0°C la misma cantidad pequeña de solución tampón y continuar acto seguido el enfriamiento del recipiente a una temperatura inferior a 0°C, que es una temperatura estable de almacenamiento; detectar el estro en un posible receptor; seleccionar del almacenamiento uno o más huevos recuperados de igual sexo y descongelar los huevos seleccionados, y trasplantar el huevo o huevos seleccionados al receptor en un momento correspondiente a una sincronización de los huevos seleccionados y el tiempo de fertilización del receptor, de manera que el trasplante se sincronice en la fase de blastocisto del receptor en el momento en el que el receptor implantaría normalmente un blastocisto propio.

124\*.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para aumentar el número de descendencia de donadores mamíferos ungulados hembras, omnívoros y herbívoros comprende las etapas de: inducir supercova-

ción en un donador deseado; detectar el estro en el donador; inseminar al donador; recuperar huevos fertilizados del donador inundando con flúido los huevos en el oviducto o útero del donador y retirando los huevos así inundados y colocándolos en un medio de soporte vital; examinar una o más células de los huevos recuperados para determinar el sexo de las células del huevo de donde se derivan las células que se examinan, y segregar los huevos embriónicos de acuerdo con su sexo; someter los huevos recuperados a un proceso de retraso, que retarda el desarrollo normal de los huevos y permite un almacenamiento prolongado de los huevos recuperados, incluyendo el retraso la separación de uno o más cuerpos celulares de un solo huevo después de que el huevo simple sea dividido pero no se ha diferenciado más allá de la fase de mórula del desarrollo para separar y liberar entre sí cuerpos celulares embriónicos individuales que son del mismo sexo y se derivan del mismo individuo y son capaces de diferenciación separada pero están retrasados en su fase de división en comparación con la fase que habría alcanzado el huevo simple de donde se obtienen, y congelar los huevos recuperados o cuerpos celulares a una velocidad de enfriamiento inferior a  $2^{\circ}\text{C}$  por minuto, con una pequeña cantidad de solución tampón añadida a aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$  y a continuación seguir el enfriamiento a una temperatura de almacenamiento estable por debajo de la congelación a aproximadamente la misma velocidad de enfriamiento, y posteriormente seleccionar uno o más huevos o cuerpos celulares del mismo sexo y descongelarlos, trasplantando a continuación los huevos o cuerpos celulares seleccionados a un receptor en un momento tal que el trasplante esté sincronizado con la fase de blastocisto del receptor en el

momento en el que el receptor implantaría normalmente un blastocisto propio durante el desarrollo normal después de la fertilización.

5           125ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende las etapas de: inducir superovulación en un donador deseado con la administración de gonadotrofina; fertilizar los huevos producidos por el donador con una fracción de espermatozoides de un sexo deseado, y trasplantar los huevos seleccionados o el huevo individual obtenido del donador a un receptor seleccionado en el momento  
10           en el que el recipiente está sincronizado por el desarrollo de un huevo o huevos fertilizados trasplantados de manera que el trasplante se sincronice en la fase de blastocisto del receptor en el momento en el que el recipiente implantaría normalmente un huevo propio si hubiese sido fertilizado.  
15

          126ª.- Procedimiento para el trasplante de embriones para aumentar el número de la descendencia de donadores mamíferos femeninos, ungulados, omnívoros y herbívoros, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

20           Esta Memoria consta de 73 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid 20 NOV. 1974

LYNN LAWRENCE AUGSPURGER.

A. GOMEZ ACEBS Y WISSET  
p. p. Firmados: L. Gaeta Fernández

