

26 76⁰⁶⁷⁵ 39

26 76 39



MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formulada el 24 de Mayo de 1961, con el N^o 267.639

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de LOS REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA, entidad norteamericana, establecida en University of Minnesota, 412 Administration Building, Minneapolis, -- Minnesota, Estados Unidos de América.

por:

" UN METODO PARA PRESERVAR EL TEJIDO ANIMAL Y LAS CELULAS "

Esta invención se refiere a la conservación de los tejidos y células animales tales como el semen, glóbulos sanguíneos, médula de huesos y semejantes. -- Más particularmente se refiere esta invención al uso de ciertos hidratos de carbono con función alcohol (p.ejem. azúcares o aldoles) y ciclitoles y derivados del ciclitol, en la conservación de las células y tejidos animales. -- La invención se describe con mayor detalle en lo que respecta a la conservación del semen animal, ya que los resultados en este campo de investigación se pueden

10

267639



determinar y evaluar más rápida y fácilmente.- Debe en
tenderse, sin embargo, que la aplicabilidad del material
y el procedimiento conservador reivindicados, no está -
limitado a este solo uso.

5 La inseminación artificial de los animales,
particularmente el ganado lechero, se ha practicado am-
pliamente.- Existen numerosas asociaciones de cría, --
con el fin de utilizar al máximo las cualidades de la -
raza de cría, para mantener y aumentar la calidad de --
10 los rebaños.- En las condiciones de almacenamiento re-
frigerado ordinarias, el sémen animal permanece vivo un
tiempo relativamente corto.- La fertilidad y motilidad
de los espermatozoides desciende a una velocidad tan rá-
pida, que es una práctica común el rechazar todo el sé-
15 men de toro no utilizado durante las 48 horas después -
de la eyaculación.- Utilizando la presente invención,-
se ha encontrado sorprendentemente que la esperma puede
mantenerse durante periodos de tiempo substancialmente_
más largos, sin pérdida apreciable de fertilidad y moti-
20 lidad.- Hasta ahora, la inseminación artificial se ha_
limitado, en su mayor parte, a los animales bovinos, de-
bido a que no ha sido posible mantener la eficacia del_
sémen de otras especies suficiente tiempo, para hacer -
practicable su uso en la inseminación artificial.- La_
25 presente invención abre el campo de la inseminación ar-
tificial para otras especies de animales.

Se ha sugerido anteriormente, que el plasma
seminal de ciertas especies de mamíferos, contiene pe--
queñas cantidades del azúcar sorbita y ciclitol inositol.
30 Sin embargo, no se ha sugerido anteriormente que las can

267639



5 tidades añadidas de estos y otros alcoholes polidroxila-
dos, tienen un efecto estabilizador o conservador, sor-
prendente e inesperado, sobre los espermatozoides, el -
cual extiende el tiempo durante el cual el sémen así --
tratado es útil para la inseminación.

10 En el campo de la conservación de la sangre,
los presentes métodos originan una gran pérdida de la -
sangre recogida.- La demanda creciente de sangre alma-
cenada ha desactualizado los presentes métodos de con--
servación.- La multitud de bancos de sangre y laborato-
rios de investigación dedicados a estudiar la sangre, -
ha creado una necesidad de un método mejor de almacena-
miento, con el fin de evitar la reducida eficacia de la
15 la investigación de la sangre a que obligan los presen-
tes métodos.

20 La investigación de la sangre está dirigida,
desde hace tiempo, a los estudios de la composición de_
la sangre, relación de la composición sanguínea con las
diversas características y condiciones patogénicas y pa-
tológicas, relación de la composición sanguínea con la_
diversa salud, condiciones físicas vigorosas y semejan-
tes.- Tales estudios requieren la recogida y almacena-
miento de grandes cantidades de muestras de sangre.- -
25 Con los presentes métodos de almacenamiento de sangre,-
tiene lugar una hemolisis dentro de los dos a cuatro --
días, la cual vuelve inútiles los glóbulos rojos para -
la mayor parte de los propósitos.- De una manera cre--
ciente se han realizado estudios de otros tejidos y cé-
30 lulas del cuerpo y se han mantenido bancos de médula --

267639



ósea y materiales similares.- Continúa presente el mismo problema del mantenimiento de estos tejidos y células en condiciones saludables de utilización, durante periodos de tiempo substanciales.

5 Los problemas adicionales de conservación de materias animales, se presentan en diversos bancos de tejidos, tales como bancos de médula, bancos de músculos, bancos de arterias y semejantes, en donde la vida utilizable de los materiales está limitada por los métodos existentes de conservación y almacenamiento.

10 Un objeto de esta invención es proporcionar un método de conservación de células y tejidos animales, por suspensión en una solución que contiene hidratos de carbono o azúcares con función alcohol (alditales) o clitales o ciclitalos ó derivados de ellos.

15 Otro objeto más de ésta invención, es proporcionar un método para la conservación del semen animal, por suspensión en una solución que contiene hidratos de carbono con función alcohol ó ciclitalos ó sus derivados.- Un objeto más de ésta invención es proporcionar una composición de materia conservadora para la preparación de extendedores de semen.

20 Todavía otro objeto de ésta invención, es proporcionar como una nueva composición de materia, una mezcla estable de semen animal y una cantidad añadida de un hidrato de carbono con función alcohol ó un ciclitalo ó derivado de ciclitalo.

25 Otro objeto de esta invención es proporcionar un método de inseminación artificial de animales, utilizando una mezcla estable de semen animal y una can

267639



tividad añadida de un hidrato de carbono con función alco
hol ó ciclitol o derivado de ciclitol.

Otros objetos de ésta invención aparecerán
al proceder a la descripción.

5 Para el cumplimiento de los anteriores y rel
lacionados extremos, esta invención comprende entonces
las características que a continuación se describen compl
pletamente y anotadas particularmente en las reivindicaci
ciones, explicando con detalle, la siguiente descripción,
10 ciertas realizaciones ilustrativas de la invención que
son indicativas, sin embargo, de unos pocos de los dive
rsos usos, en los que los principios de la invención
pueden emplearse.

 La eficacia de una realización preferida de
15 la presente invención, prolongan la vida útil del séme
n bovino, cuando se compara con los diluyentes de uso com
ún, se muestra en la simple figura del dibujo.

 Los hidratos de carbono con función alcohol
que se han encontrado de utilidad para extender la vida
20 del sémen animal, son los hidratos de carbono que tien
en la fórmula $C_n H_{2n+2} (OH)_n$, en la cual n es un núm
ero entero entre 4 y 7.- Ejemplos de estos alcoholes
son la eritrita, treita, arabita, ribita, xilita, manita,
sorbita (glucita), dulcita, idita y sedoheptita.- Los
25 polialcoholes cíclicos o ciclitoles que pueden utilizars
e, tienen la fórmula $C_6 H_6 (OH)_6$.- Los ejemplos de cicl
itoles y sus derivados incluyen la meso-inosita é isom
meros, pinita (éter dextro-monometílico del meso-inosit
a), quebrachita (éter levo-monometílico del meso-inosit
30 ta), condurita, escilita, epi-meso-inososa, dextro-querer

267639



cita, betita y mitita.

Para su utilización, los alcoholes estabili-
zadores se preparan como soluciones acuosas.- El agua
es el disolvente usual, pero para fines de inseminación,
5 se pueden usar la leche u otros líquidos esencialmente
acuosos. Los alcoholes estabilizantes pueden utilizar
se de manera simple o en combinación.- Las soluciones
de alcohol se utilizan en concentraciones comprendidas
entre, aproximadamente, 0,1% (100 mg.%) y en concentra-
10 ciones que se aproximan al límite isotónico de la mate-
ria animal a estabilizar.- En general, el alcohol to-
tal añadido no excederá de aproximadamente 1,5 a 2% --
(1500 a 2000 mg. %).- Preferiblemente los alcoholes -
añadidos estarán presentes en una concentración total
15 comprendida entre aproximadamente 0,5 a 1,5% (500 a 1500
mg.%).

A estas concentraciones el alcohol añadido
está presente en cantidades de orden de magnitud varias
veces mayor que la cantidad que está presente natural-
20 mente, en el sémen diluido.- Por ejemplo, el sémen de
toro contiene alcoholes en un promedio de, aproxima-
mente, 0,1% (100 mg.%).- Para la inseminación el sémen
de toro se diluye comúnmente en 1 a 100.- Esto reduce
la concentración natural de alcohol a 1/100 de la con-
25 centración original, ó a 0,001% (1 mg. %).- Si el dilu-
yente contiene alcohol añadido en concentración del 1%
(1000 mg. %), el alcohol añadido está presente en una
cantidad mil veces mayor que en la que está presente na-
turalmente.

30 La solución diluyente del sémen que contie-

267639



ne alcohol, contiene comúnmente un agente tampón, para
proteger la solución contra cambios rápidos y materiales
en la concentración de ion hidrógeno.- Los materiales
tampón son los utilizados comúnmente para este fin, e
5 incluyen las sales solubles tales como citratos, fosfa-
tos, acetatos, carbonatos de metales alcalinos y seme-
jantes.- En la conservación de las células sanguíneas,
los citratos de metal alcalino funcionan también como -
anticoagulantes.- Los agentes tampón se pueden utili-
10 zar de manera simple o en combinación.- Por ejemplo --
pueden estar presentes un citrato de metal alcalino y -
un fosfato de metal alcalino, o se puede utilizar un ci-
trato sódico y un citrato potásico.- El tampón está --
presente normalmente, en cantidades de, aproximadamente,
15 0,025 % a 1,5 % (250 a 1500 mg. %).- La solución dilu-
yente del sémen, de acuerdo con la presente invención,-
puede contener también cualquiera de un gran número de -
substancias utilizadas comúnmente en los anteriores di-
luyentes del sémen.- Estas incluyen substancias tales
20 como leche completa, leche desnatada, glicerina, yema -
de huevo, gelatina, glucosa, fructosa (para suplir la -
fructosa que contiene el sémen natural), lecitina, lipo-
proteína, antibióticos tales como estreptomina y peni-
cilina, y semejantes.- Los azúcares deben estar presen-
25 tes en cantidades de aproximadamente 0,125% a 0,75% --
(125 a 750 mg. %).

Se sabe que ciertos alcoholes polihidroxila-
dos, tienen un efecto inhibitor u opuesto a los antibió-
ticos.- Por esta razón, cuando se sospecha la presen-
30 cia de organismos de enfermedades en el sémen, es conve-

267639



niente que el s \acute men se trate primero con el antibi \acute otico, durante un periodo de unas 6 horas, y se a \acute ñada despu \acute s el alcohol estabilizador.

5 Debido a que las c \acute elulas, tales como los espermatozoides en el semen, se someten a un choque mec \acute anico, el diluyente deber \acute a tambi \acute n incluir deseablemente, un estabilizador de choque, coloidal y soluble en agua, tal como gelatina, agar, goma guar, tragacanto, goma -- ar \acute biga, dextrina, goma ghatti y semejantes.- El estabilizador de choque estar \acute a presente, deseablemente, en
10 cantidades comprendidas entre, aproximadamente, 0,1 % a 1,0 % (de 100 a 1000 mg. %).- La mezcla de s \acute men diluida, tiene, deseablemente, una presi \acute on osm \acute otica comprendida entre, aproximadamente, 200 a 350 miliosmoles, y
15 preferiblemente aproximadamente 300 miliosmoles.

El s \acute men puro se diluye com \acute unmente con, aproximadamente, 10 a 200 partes de la soluci \acute on diluyente.- La extensi \acute on de la diluci \acute on depende de factores -- tales como la concentraci \acute on de espermatozoides en el s \acute men, concentraci \acute on de espermatozoides necesaria normal-
20 mente para la concepci \acute on.- Esto var \acute a seg \acute un las diversas especies.- Como ejemplo, el s \acute men de toro contiene normalmente unos 600 a 1200 millones de espermatozoides por cc.- Se consideran necesarias para asegurar la concep-
25 ci \acute on, aproximadamente 10 millones de espermatozoides.- Se requiere, por lo menos, un vol \acute umen de 1 cc. de s \acute men.- De acuerdo con \acute sto, el semen puro se puede diluir con la soluci \acute on diluyente que contiene los alcoh-
30 les estabilizadores, para obtener un producto que contiene por lo menos 10 millones de espermatozoides por

267639



cc.- Es de práctica común, y no constituye un exceso de precaución, el preparar el semen diluido hasta una concentración de, por lo menos, dos veces esta concentración de espermatozoides.

5 El semen de carnero contiene normalmente de unos 800 a 4000 millones de espermatozoides por cc.- Por lo menos 25 millones de espermatozoides en 1/2 cc. de semen, se considera necesario para asegurar la concepción.- El semen de cerdo contiene normalmente de unos
10 25 a 1000 millones de espermatozoides, o un promedio de unos 400 millones de espermatozoides, por cc.- Se consideran necesarios para asegurar la concepción, de 50 a 70 cc. de semen que contengan por lo menos 2 billones de espermatozoides.- El semen del gallo contiene nor-
15 malmente por encima de unos 60 millones de espermatozoides por cc.- Se considera necesario para asegurar la fertilización, un volumen de aproximadamente 1/10 cc., que contengan por lo menos 6 millones de espermatozoides.

Los hidratos de carbono preferidos, que se
20 ha encontrado que tienen éxito para prolongar la vida del semen animal, son la sorbita (D-glucitol) y la manita, utilizados bien por separado o en combinación.- La total concentración de este hidrato de carbono, no debe exceder materialmente en la mayoría de los casos, de
25 aproximadamente 1,5% a 2,0% (1.500 a 2.000 mg.%).- Se puede utilizar una concentración tan pequeña como, aproximadamente 0,1% a 0,5% (100 a 500 mg. %) de concentración total, pero deseablemente los hidratos de carbono
30 estarán presentes en una concentración de, aproximadamente, un 1% (1000 mg. %).- Aunque se utilizan desea-

267639



blemente en proporciones aproximadamente iguales cuando se emplean en combinación, se ha encontrado que estos materiales se pueden usar juntos con buen efecto, en proporciones que van desde aproximadamente un 70% de sorbita a un 30% de manita, hasta un 30% de sorbita a un 70% de manita.- Solamente se aprecia una ligera diferencia en los resultados, cuando los hidratos de carbono varían dentro de estos límites.- Los hidratos de carbono se disuelven en solución acuosa.- Se puede utilizar agua como disolvente ó puede ser leche ó otros líquidos esencialmente acuosos.

En una forma, la composición conservadora de tejido y célula de la presente invención, se prepara en forma seca y pulverulenta para su embarque y almacenamiento en paquetes cerrados, cuyos contenidos se añaden a un volúmen pre-determinado de líquido diluyente, tal como agua destilada, y, a continuación, se combinan con semen u otro material animal.- La mezcla incluye deseablemente, el hidrato de carbono conservador, un agente tamponador, un azúcar nutritivo y un estabilizador de coloides.- Una mezcla ejemplar incluye de 0,25 a 0,75 partes en peso de sorbita; 0,25 a 0,75 partes de manita; 0,25 a 0,75 partes de fructosa; 0,05 a 0,15 partes de citrato sódico; 0,05 a 0,15 partes de citrato potásico; 0,05 a 0,15 partes de fosfato dihidrogenado de potasio; y 0,1 a 0,5 partes del estabilizador coloidal, tal como uno de los enumerados.- Opcionalmente, se puede incluir de aproximadamente una a tres partes de leche en polvo seca y/o aproximadamente de 8 a 10 partes de yema de huevo seca.- Una vez preparado para su uso,

267639



este material se disuelve simplemente en cien partes de agua destilada y se mezcla con el semen u otros tejidos o células animales, para producir la dilución deseada.

5 Gran parte del semen para inseminación artificial se preserva por congelación.- La congelación es un método de conservación eficaz, pero existe el mismo problema, con respecto al mantenimiento de la potencia después de la eyaculación, que con el semen fresco, con excepción de que la vida del semen congelado después de
10 la eyaculación, es aún mas corta.- Cuando se diluye -- con los prolongadores normalmente utilizados, el semen congelado vive solamente durante unas 6 horas después - de la eyaculación.- Cuando se prolonga con la solución diluyente que contiene los hidratos de carbo estabiliza
15 dores de acuerdo con la presente invención, la vida eficaz del semen se extiende hasta 4 y 5 dias.

Además de ser utilizado como un diluyente - para el semen en la inseminación artificial, tales soluciones pueden ser utilizadas de igual manera para crear
20 un medio más favorable para la inseminación natural.- - Se sabe que en muchas hembras el periodo de tiempo durante el cual la concepción es posible, es de corta duración.- La concepción depende de la presencia de semen viable en los tubos de Falopio durante este periodo.- -
25 Con el fin de prolongar el tiempo durante el cual el semen es utilizable para la impregnación, se puede administrar, antes de depositar el semen en los órganos femeninos, una irrigación de una solución tampón de hidratos de carbono.

30 La eficacia de los materiales conservadores

267639



preferidos de la presente invención, cuando se usan como un extendedor del semen bovino, comparados con otros extendedores corrientemente en uso, se muestra en la figura del dibujo.- La eficacia se mide observando el efecto de los días de almacenamiento del semen en condiciones refrigeradas a 5°C, contra el % de motilidad de los espermatozoides.- Se advertirá que cuando se usan los diluyentes convencionales, se utilizan extendedores tales como leche entera glicerinada, citrato-yema de huevo, mantequilla de leche, leche entera, leche desnatada-yema de huevo-glicerina, y la motilidad de la esperma decae rápidamente y es menor del 50% entre el segundo y el quinto día.- Las observaciones respecto a los extendedores convencionales, constituyen los resultados medios basados en 6 eyaculaciones.

Utilizando diluyentes convencionales, es práctica usual desechar el semen como sin valor, después de dos días.- Cuando la motilidad de la esperma es menor del 50%, la velocidad de retorno es tan elevada que su uso no es practicable.- Como se indica en el dibujo, en el séptimo al onceavo día, virtualmente todos los espermatozoides suspendidos en los diluyentes convencionales, están inmóviles.- En contraste, la esperma diluida con soluciones de hidratos de carbono (específicamente, una solución diluyente que contiene cantidades iguales de manita y sorbita en una concentración total de un 1%), muestra virtualmente una motilidad no disminuida durante más de 2 semanas en un almacenamiento refrigerado y después, cuando la motilidad empieza a descender, el cambio es gradual de manera que al cabo -

267639



de los 26 a 27 días de almacenamiento, el 50% de las células son todavía móviles.- La curva que representa el efecto conservador de la adición de hidrato de carbono, se basa en los resultados medios observados con 26 muestras de eyaculado.

La invención se ilustra además por los siguientes ejemplos.

E J E M P L O I

Se preparó un diluyente para semen, mezclando 30 partes en peso de yema de huevo con 25 partes de leche entera, se trató con calor elevando la temperatura hasta los 90°C durante 2 minutos.- A este se añadieron 0,25 partes de gelatina, 0,5 partes de D-glucitol, 0,5 partes de D-manita, 0,5 partes de D-fructosa, 0,1 parte de citrato potásico, 0,1 partes de citrato sódico y 0,1 parte de fosfato di-hidrogenado de potasio.- Se añadieron 49 partes de agua.- Se añadió estreptomina en cantidad de 500 microgramos por mililitro de solución junto con 500 unidades de penicilina por ml. de solución. La solución presentó un pH final de 6,4.- La solución tenía una presión osmótica de 300 miliosmoles.

E J E M P L O II

En un ensayo de campo, con la solución diluyente del Ejemplo I, que contiene hidratos de carbono, se separó una muestra de semen puro de un toro y se diluyó una mitad a 1:71 en la solución del ejemplo I, y la otra mitad se utilizó como control, y se diluyó con leche entera glicerinada en la misma proporción.- La

267639



leche entera glicerinada era leche tratada por calor --
elevando la temperatura hasta 92°C durante dos minutos,
a la cual se añadió un 10% de glicerina.- El semen di-
luido resultante, se distribuyó a 100 técnicos de la in-
5 seminación artificial y se suministraron con él 334 va-
cas.- Todo el semen se utilizó el tercer día después -
de la recogida.- El semen que contenía los hidratos de
carbono se utilizó para suministrar a 192 vacas.- De -
éstas, 147 vacas ó sea el 76,6%, fueron fecundadas con
10 éxito en el primer suministro.- El semen diluido con -
leche entera glicerinada se utilizó para suministrar a
142 vacas.- De éstas, 90 vacas, ó sea el 63,4% fueron
fecundadas con éxito.- La proporción de inseminación -
con éxito, fué del 13,2% más elevada utilizando el semen
15 extendido en hidrato de carbono.

E J E M P L O I I I

En otro ensayo de campo comparativo, se se-
paró el semen procedente de un toro de normalmente baja
20 concepción.- Parte de él se extendió con los diluyen-
tes convencionales y el restante se extendió con el di-
luyente de semen, que contenía hidratos de carbono como
en el Ejemplo I.- Se suministró a un grupo de control
de 246 vacas, utilizando solamente semen de dos días.--
25 De este grupo 202 vacas ó sea el 82,1%, se fecundaron -
con éxito.- Se suministró a un grupo de ensayo de 287_
vacas, el semen extendido con el hidrato de carbono en_
el cuarto día.- Se fecundaron con éxito un total de --
224 vacas ó sea el 78%.- Otro grupo de ensayo de 99 va
30 cas se suministró con el semen extendido con el hidrato

267639



de carbono en el quinto día.- Se fecundaron con éxito un total de 79 vacas ó sea el 79,7%.- Aunque la proporción de resultados negativos en el grupo de ensayo, fué ligeramente inferior, (a pesar de todo no significativa estadísticamente) que la del grupo de control, el sémen utilizado en los grupos de ensayo, fué 2 y 3 días más antiguo que el utilizado en el grupo de control, y, normalmente, se considera que es de una fertilidad tan baja, como para ser virtualmente inútil para la inseminación artificial.

E J E M P L O IV

Se hizo todavía otro ensayo de campo, comparativo.- Se separó una muestra de sémen de toro.- Una porción se utilizó como control y se diluyó con un extendedor convencional, empleándolo para suministrar a 166 vacas.- De éstas, 149 fueron fecundadas con éxito por un valor de 89,7% de resultados negativos.- La muestra de sémen de control se utilizó en el segundo día.- El resto del sémen se diluyó como en el Ejemplo I, con hidrato de carbono conteniendo líquido.- Este material se almacenó y no se utilizó hasta el quinto día. El grupo de ensayo consistió en 275 vacas y, de éstas, 232 vacas ó sea el 84,3%, se fecundaron con éxito.- Hasta aquí, aunque el grupo de ensayo tenía una proporción algo inferior de resultados negativos (aunque no significativos estadísticamente) el sémen utilizado en el grupo de ensayo era 3 días más antiguo que la edad máxima normal del sémen que se utiliza para inseminación artificial.- La proporción de resultados negativos

257639



empleando semen de cinco días de antigüedad, se espera que normalmente se aproxime a cero.

E J E M P L O V

5 Se realizó otro ensayo de campo, empleando semen de 10 días de antigüedad diluido con el material del Ejemplo I, y mantenido bajo refrigeración hasta su uso.- Se suministró a un grupo de ensayo de 22 vacas.- De éstas, fueron impregnadas con éxito, un total de 15
10 vacas ó sea un 70%.

E J E M P L O VI

15 En los ensayos de campo, utilizando solamente sorbita como hidrato de carbono estabilizador, se preparó una solución diluyente generalmente de acuerdo con el Ejemplo I, con excepción de que se sustituyeron las 0,5 partes de manita por sorbita, para dar una concentración de sorbita total de un 1%.- Se diluyó semen de toro con esta solución en una proporción de 1:75. -
20 Este semen extendido se utilizó en el cuarto día, para suministrar a 586 vacas.- De éstas, 438 ó sea un 74,7%, fueron fecundadas con éxito en el primer suministro.

E J E M P L O VII

25 De manera semejante se evaluó en ensayos de campo, la eficacia de la manita sola.- Se preparó una solución diluyente generalmente de acuerdo con el Ejemplo I, con la excepción de que se sustituyeron 0,5 partes de D-glucita por D-manita.- Se utilizó para suministrar
30 a 465 vacas, semen de toro de 4 días de antigüedad, di-

267639



luido a 1:75 con esta solución.- De éstas, fueron fe-
cundadas con éxito en el primer suministro 313 vacas ó
sea un 67,3%.- En un ensayo de campo simultáneo, se su-
ministraron 325 vacas con el semen de toro en una solu-
5 ción de diluyente conteniendo un 1% de manita.- De és-
tas, un 72,4% fué fecundado con éxito.

E J E M P L O VIII

Los estudios de motilidad se realizaron so-
10 bre semen de otras especies animales.- Utilizando la -
composición del Ejemplo I como diluyente, se extendió -
el semen de cerdo, de carneros, de cabritos, de conejos,
de perros y de gatos.- En el caso del cerdo, se encon-
tró que el semen después de 14 días de almacenamiento, -
15 tenía más del 50% de motilidad.- El semen de las otras -
especies presentó una motilidad del 50% después de un al-
macenamiento como sigue: carnero, 20 días; cabrito, 12 -
días; conejo, 6 días; perro, 10 días; y gato, 5 días.

E J E M P L O IX

Los estudios de motilidad se realizaron sobre
semen de toro, utilizando una diversidad de hidratos de
carbono diferentes en una variedad de concentraciones.-
Se utilizó como control, una solución patron tamponada,
25 que contenía 2,9% de citrato sódico (2.900 mg. %).- Se
diluyó el semen hasta una concentración de 20 millones -
de espermatozoides por cc.- Para variar las concentra-
ciones de hidrato de carbono, se redujo la cantidad de -
tampón, a una cantidad correspondiente al hidrato de --
30 carbono añadido, con el fin de mantener la presión osmó

26 7639



tica substancialmente uniforme.- Esto constituyó un ex
 perimento acelerado y la vida de la esperma fué conside
 rablemente acortada por la urgencia de los materiales -
 nutritivos usuales de la esperma.- Las observaciones -
 5 se realizaron con microscopio para evaluar la motilidad
 de la esperma.- Los resultados se resumen en la siguien
 te tabla, en la cual se muestran las horas de más de un
 50% de motilidad de la esperma, las horas de más de un
 25% de motilidad de la esperma y el total de horas de -
 10 vida de la esperma.- Las observaciones finalizaron des
 pués de 192 horas.- Al cabo de éste tiempo, todavía al
 gunas muestras exhibieron algo de motilidad y éstas se
 indican por un asterisco (*)- Otras muestras exhibie-
 ron una considerable motilidad, al cabo de las 192 ho--
 15 ras.- Estas se indican con dos asteriscos (**).

Material de ensayo	Horas por encima del 50% de motilidad	Horas por encima del 25% de motilidad	Total de horas de vida
2,9% de sodio			
20 Control de citrato	20	30	56
Eritrita 100 mg.%	90	124	148
" 200 mg.%	90	128	156
" 300 mg.%	96	132	168
" 400 mg.%	72	136	192
" 500 mg.%	72	144	192*
25 " 750 mg.%	96	144	192**
" 1000 mg.%	96	144	192*
D-L-Arabita 100 mg.%	64	88	144
" 200 mg.%	68	102	168
" 300 mg.%	72	104	168
" 400 mg.%	72	120	192
30			

267639



Material de ensayo.		Horas por encima del 50% de motilidad	Horas por encima del 25% de motilidad	Total de horas de vida
2.9% de sodio				
5	Control de citrato	20	30	56
	D-L-Arabita 500 mg.%	88	114	192 ^o
	" 750 mg.%	88	120	192
	" 1000 mg.%	88	110	168
	D-Arabita 100 mg.%	64	no ensayado	no ensayado
	" 200 mg.%	64	no ensayado	no ensayado
10	" 300 mg.%	96	no ensayado	no ensayado
	" 400 mg.%	96	no ensayado	no ensayado
	" 500 mg.%	96	no ensayado	no ensayado
	" 750 mg.%	96	no ensayado	no ensayado
	" 1000 mg.%	72	no ensayado	no ensayado
15	Ribita 100 mg.%	56	102	144
	" 200 mg.%	68	108	168
	" 300 mg.%	96	-(pérdida de muestra)-	
	" 400 mg.%	96	120	192
	" 500 mg.%	104	120	192 ^o
	" 750 mg.%	104	144	192 ^{oo}
	" 1000 mg.%	68	120	168
20	Xilita 100 mg.%	56	84	120
	" 200 mg.%	68	102	168
	" 300 mg.%	72	114	192
	" 400 mg.%	84	128	192
	" 500 mg.%	96	144	192 ^o
	" 750 mg.%	96	144	192 ^{oo}
25	" 1000 mg.%	72	144	192 ^o
	Manita 100 mg.%	40	56	120
	" 200 mg.%	64	108	192
	" 300 mg.%	68	128	192
30	" 400 mg.%	72	136	192

287030



Material de ensayo		Horas por encima del 50% de motilidad	Horas por encima del 25% de motilidad	Total de horas de vida
2.9% de sodio				
	Control de citrato	20	30	56
5	Manita	500 mg.%	72	136
	"	750 mg.%	92	144
	"	1000 mg.%	72	126
	Sorbita	100 mg.%	56	88
	"	200 mg.%	56	108
10	"	300 mg.%	68	120
	"	400 mg.%	72	132
	"	500 mg.%	100	144
	"	750 mg.%	100	156
	"	1000 mg.%	72	134
	Dulcita	100 mg.%	50	84
15	"	200 mg.%	52	108
	"	300 mg.%	64	120
	"	400 mg.%	72	128
	"	500 mg.%	84	128
	"	750 mg.%	96	144
	"	1000 mg.%	72	128
20	Inositol	100 mg.%	62	102
	"	200 mg.%	68	92
	"	300 mg.%	70	106
	"	400 mg.%	84	120
	"	500 mg.%	84	112
	"	750 mg.%	96	132
25	"	1000 mg.%	72	120

207639



E J E M P L O X

Se realizaron posteriores estudios sobre motilidad, sobre semen de aves de corral.- Cuando se utiliza semen de gallo sin diluir, como control, los espermatozoides fueron el 52% móviles después de un día de almacenamiento, y ningún espermatozoide vivió después del tercer día de almacenamiento.- En contraste, el mismo semen diluido con una solución de sorbita y manita, en concentración de 500 mg.%, mostró un 64% de motilidad al final de los 7 días de almacenamiento y un 25% de motilidad al final de los 14 días de almacenamiento.

E J E M P L O XI

Una típica solución base para la recogida de sangre, que incorpora los conservadores de hidratos de carbono conservadores, se puede preparar como sigue: Se prepara una solución conteniendo 2 partes de citrato trisódico y/o citrato tripotásico; 0,42 partes de cloruro sódico; 5 partes de sorbita, 5 partes de manita y 87,57 partes de agua destilada.- Se puede incluir opcionalmente una pequeña cantidad, tal como 0,01 partes, de un antibiótico tal como el clorhidrato de tetraciclina (Acromicina).- Se añade sangre a esta solución base en la proporción de aproximadamente un volumen de sangre por 2 a 3 volúmenes de solución conservadora anticoagulante si la sangre se va a utilizar para fines de ensayo, y en la proporción de aproximadamente un volumen de solución base, hasta aproximadamente 3 a 8 volúmenes de sangre, si la sangre se va a utilizar para fines de transfusión.

267639



E J E M P L O X I I

Se realizó otro ensayo de campo en gran escala, utilizando semen bovino diluido a 1:100, en una solución como se describe en el ejemplo I para observar el efecto comparativo de la antigüedad del semen sobre la fecundidad.- Se suministró a un primer grupo de 201 vacas, utilizando semen de dos días de antigüedad.- De éstas, quedaron preñadas un 82,8%.- Una segunda tanda de 542 vacas, fué preñada utilizando semen de 3 días de antigüedad.- De este grupo, quedaron fecundadas con éxito un 82,5% de las vacas.- El semen que tenía 4 días de antigüedad, se utilizó para suministrar a un tercer grupo de 240 vacas, de las cuales quedó fertilizado con éxito un 83,3%.- Un cuarto grupo de 496 vacas, se suministró con semen de 5 días de antigüedad, y quedaron preñadas un 83,9% de éstas vacas.

Las soluciones de hidratos de carbono de acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar también en el cultivo de tejidos.- Se utilizan para proporcionar un medio nutritivo para promover el crecimiento de organismos vivientes fuera del cuerpo.- Para este fin las soluciones se tamponan deseablemente y, preferiblemente, contienen azúcar, tal como glucosa o fructosa.

Parece ser que pueden efectuarse muchas modificaciones y variaciones de esta invención, como se ha indicado anteriormente aquí, sin apartarse del espíritu y el objeto de la misma.- Las realizaciones específicas descritas se dan a título de ejemplo solamente, y la invención queda limitada solamente por los términos de

267639



las reivindicaciones que siguen.

Las realizaciones de la invención en la cual se reivindica una propiedad ó privilegio exclusivo, se definen como siguen:

5 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en E.U.A, el 31 de Mayo de 1960, bajo el nº 33020 y el 20 de Marzo de 1961, nº 99007, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

15

- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de ésta Patente de -
20 Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1.- Un método para preservar el tejido animal y las células, que comprende el mezclado, con dicho tejido, de una solución conteniendo una pequeña cantidad de, por lo menos, un compuesto estabilizador añadido, seleccionado de entre el grupo consistente en hidratos de carbono, que tienen la fórmula $C_n H_{n+2} (OH)_n$, -
25 en la cual n es un número entero entre 4 y 7, y ciclitales que tienen la fórmula $C_6 H_6 (OH)_6$, y derivados de -
30 éstos.

267639



2.- Un método de acuerdo con el punto 1º,-
caracterizado porque el compuesto estabilizador, se en-
cuentra presente en una concentración comprendida entre
aproximadamente, 0,1% y el límite isotónico de la mate-
ria animal.

3.- Un método de acuerdo con el punto 2º,-
caracterizado porque la solución del compuesto estabili-
zador, contiene por lo menos, una substancia tampón, se-
leccionada entre el grupo consistente en citratos, fosfa-
tos, acetatos y carbonatos de metal alcalino.

4.- Un método de acuerdo con el punto 3º,-
caracterizado porque dicha materia animal es semen.

5.- Un método de acuerdo con el punto 4º,-
caracterizado porque dicha solución de compuesto estabi-
lizador contiene, aproximadamente, de 0,125% a 0,75% de
un azúcar, seleccionado entre el grupo consistente en -
glucosa y fructosa.

6.- Un método de acuerdo con el punto 5º,-
caracterizado porque dicha solución del compuesto estabi-
lizador, contiene, aproximadamente, de 0,1% a 1,0% de un
coloide estabilizador.

7.- Un método para preservar el semen ani-
mal, que comprende la mezcla de éste, por cada parte de
sémén, con, aproximadamente, de 10 a 200 partes de una
solución acuosa, que tenga una concentración de 0,5% a
1,5%, aproximadamente, de, por lo menos, un compuesto -
estabilizador añadido, seleccionado de entre el grupo -
consistente en hidratos de carbono, que tienen la fórmu-
la $C_nH_{n+2}(OH)_n$, en la cual n es un número entero entre
4 y 7, y ciclitoles que tienen la fórmula $C_6H_6(OH)_6$ y -

267639



derivados de éstos, una concentración comprendida entre 0,025% y 1,5%, aproximadamente, de, por lo menos, un --
támpón seleccionado de entre la clase consistente en ci-
tratos, fosfatos, acetatos, y carbonatos de metal alcalino, una concentración comprendida entre 0,12% y 1,0%,
5 aproximadamente, de un coloide estabilizador, y una concentración comprendida entre 0,125% y 0,75%, aproximadamente, de un azúcar seleccionado de entre el grupo consistente en glucosa y fructosa, y el mantenimiento de -
10: la mezcla bajo refrigeración.

82.- Un método de inseminación artificial de animales hembras, que comprende la manipulación de dichos animales, introduciendo en el interior del su -- sistema reproductor, una composición estable, constituf
15 da por semen de animal de la misma especie, conteniendo células espermatozoides vivas, mezcladas con una solución que contiene una pequeña cantidad de, por lo menos, un compuesto estabilizador añadido, seleccionado de entre el grupo consistente en hidratos de carbono, que tie
20 nen la fórmula $C_n H_{n+2} (OH)_n$, en la cual n es un número entero entre 4 y 7, y ciclitoles de la fórmula $C_6 H_6 (OH)_6$ y sus derivados, estando presente dicho compuesto estabilizador añadido, en una concentración comprendida entre, aproximadamente, 0,1% y el límite isotónico de las células espermatozoides.
25

92.- Un método de acuerdo con el punto 82, caracterizado porque la solución del compuesto estabilizador añadido, contiene, por lo menos, una substancia seleccionada de entre el grupo consistente en materiales -
30 tamponadores de la concentración de ion hidrógeno, azúca

267639



res nutritivos y coloides estabilizadores.

5 10.- Un método de acuerdo con el punto 8a, caracterizado porque dicho semen, se ha diluido con 10 a 200 partes de dicha solución de compuesto estabilizador añadido, por cada parte de semen.

11.- Un método de acuerdo con el punto 8a, caracterizado porque la presión osmótica de la mezcla de semen, está comprendida entre 200 y 350 milimoles -- aproximadamente.

10 12.- Un método de acuerdo con el punto 8,- caracterizado porque dicha solución de compuesto estabilizador añadido, contiene sorbita.

15 13.- Un método de acuerdo con el punto 8a, caracterizado porque dicha solución de compuesto estabilizador, contiene manita.

14.- Un método de acuerdo con el punto 8,- caracterizado porque dicha solución de compuesto estabilizador, contiene una mezcla de sorbita y manita.

20 15.- UN METODO PARA PRESERVAR EL TEJIDO ANIMAL Y LAS CELULAS.

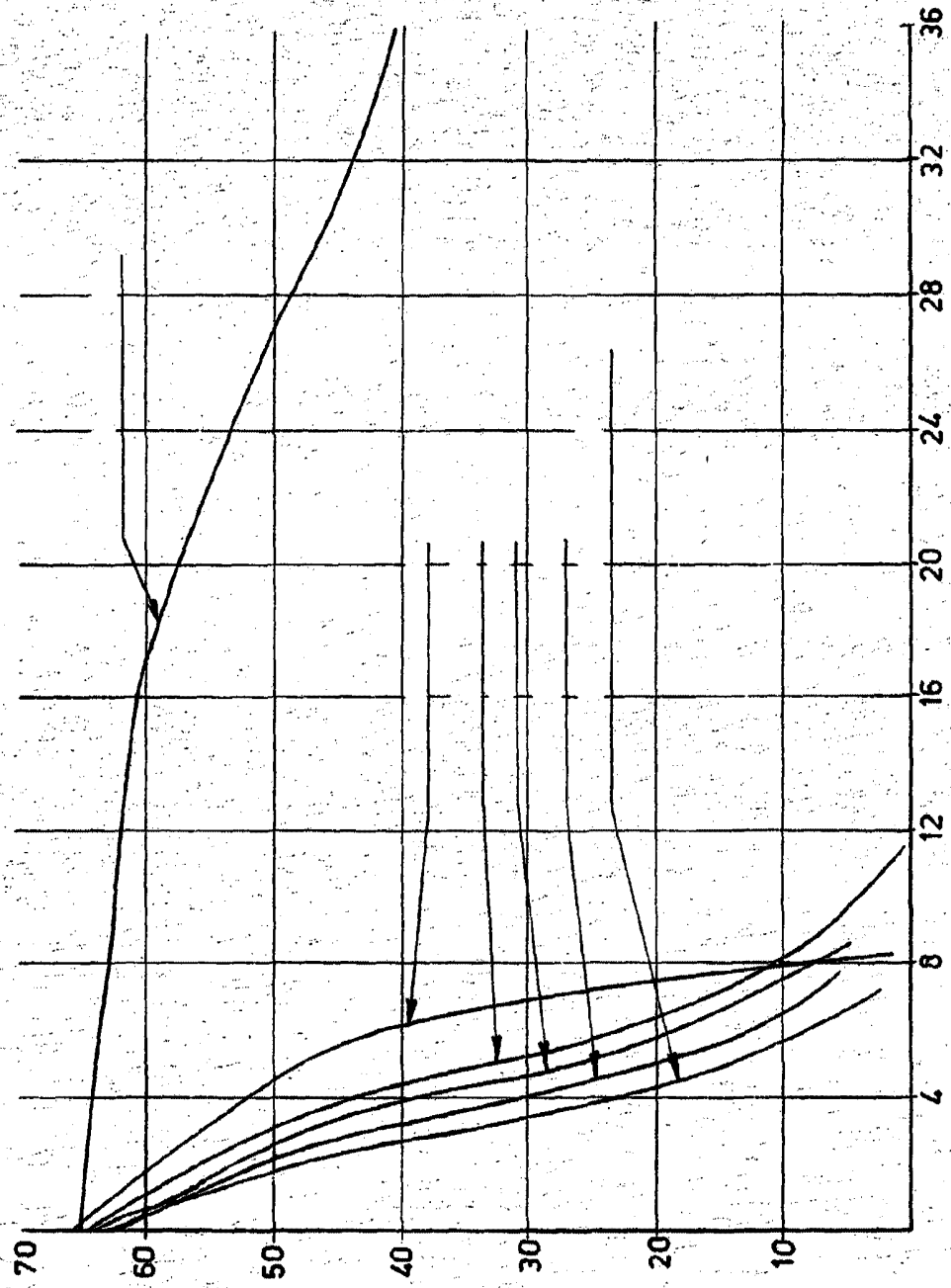
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en el dibujo que se acompaña y con los fines que se han especificado.

25 Esta Memoria consta de veintiseis hojas escritas por una sola de sus caras.

Madrid,

P. A.

267639



[Handwritten signature]