

433.004

20 DIC 1974

P.- 59.294

1409/74

Int. Cl. C12K//A61D

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE

entidad francesa

establecida en 149, rue de Grenelle, Paris 7ème,  
Francia.

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACION DEL ESPER-  
MA DE CARNERO POR CONGELACION"

(Clase Internacional C12k)

13.12.74



5 El presente invento se refiere a un procedimiento para la conservación del esperma de carnero por congelación. Igualmente tiene por objeto medios para la aplicación de dicho procedimiento así como los productos obtenidos.

10 La selección de los animales domésticos, y principalmente de los ovinos, recurre cada vez más a la inseminación artificial y ya han sido propuestos procedimientos de conservación del esperma de carnero en estado líquido o en estado congelado.

15 Los procedimientos de conservación por congelación ya conocidos consisten de modo general en diluir el esperma recientemente recogido en un diluyente apropiado y en congelar la solución así obtenida por las llamadas técnicas de congelación en lentejas, ampollas o pastillas (pellets). Los diluyentes empleados en estos procedimientos son diluyentes a base de leche o de yema de huevo que contienen glicerina. Los resultados obtenidos (porcentaje de partos) son muy variables según las condiciones de aplicación del procedimiento (naturaleza del diluyente, temperatura de dilución, proporción de glicerina, técnica de congelación) y la técnica de inseminación.

25 J. Aamdal y Kandersen ["Freezing of ram semen in straws" (VI Congreso Internacional de la reproducción



5 animal por inseminación artificial, París; 1968, volumen II p 977-980) / utilizan un diluyente a base de lactosa del tipo propuesto por NAGASE y GRAHAM [Deleted semen: Comparision of different extenders and processes on fertility of bovin spermatozoa, V Congreso Internacional de la reproducción animal por inseminación artificial, y TRENTO, IV, 1964, p. 387-391] /, que contiene 11% de lactosa, 20% de yema de huevo y 4,7% de glicerina. Después de dilución, el semen se conserva a 4-5°C y se acondiciona en lantejas y luego se congela en nitrógeno líquido. Los porcentajes de gestación obtenidos después de la inseminación artificial de las ovejas con el esperma de carnero así conservado son del 62% después de dos inseminaciones en el mismo período de calor.

15 A.F. FRASER [ "Progress on the artificial insemination of sheep with frozen semen" (VI Congreso Internacional de la reproducción animal por inseminación artificial, París, 1968, volumen II p. 1033 a 1035) / utiliza igualmente un diluyente del tipo NAGASE y GRAHAM que contiene 25% de yema de huevo, 71,5 de una solución de lactosa al 11% y 3,5% de glicerina. La congelación se realiza en forma de pastillas (pellets); el porcentaje de partos no es mas que del 31% después de una inseminación.

25 W. KARETA y otros [ "Fertily of frozen ram

20 DIC. 1974

semen diluted in citrate added bull seminal plasma  
or not" (VII Congreso Internacional de reproducción  
animal por inseminación artificial, Munich (1972) p.  
1479-1484) han utilizado, para la congelación del  
5 esperma de carnero por la llamada técnica en ampollas,  
bien una mezcla de yema de huevo, fructosa, glicerina  
y citrato de sodio o bien la misma mezcla a la que se  
ha adicionado plasma seminal de toro; los resultados  
obtenidos (porcentaje de partos) son del 50% con el  
10 primer diluyente y del 61% con el segundo.

Los diluyentes propuestos por MARTIN ["Milk  
and synthetic diluents for ram semen" (VI Congreso In  
ternacional de la reproducción animal por inseminación  
artificial, París 1968, volumen II, páginas 1619-1622)]  
15 contienen leche, fructosa, otro azúcar elegido entre  
glucosa, arabinosa, lactosa etc, cloruro de sodio, un  
tampón de pH al fosfato y glicerina. El porcentaje de  
movilidad de los espermatozoides en el esperma descon-  
gelado varía en función del segundo azúcar utilizado.

20 LUNCA ["Quelques aspects concernant la  
congélation du sperme de bélier" (VI Congreso interna-  
cional de la reproducción animal por inseminación arti-  
ficial, París 1968, volumen II, páginas 1615-1618)] des-  
cribe, entre otros, un diluyente que contiene leche de  
25 vaca fresca esterilizada y desgrasada, yema de huevo y

glicerina. Después de la descongelación se observó una movilidad de los espermatozoides de 35 a 50%, y esta era todavía de 35 a 45% después de 5 días de congelación.

5 CARBONERO BRAVO compara en el artículo "Das Tiefgefrieren von Schafbocksamen" [VII Congreso Internacional de reproducción animal por inseminación artificial, Munich (1972) p. 1496-1499] diferentes diluyentes que contienen todos glicerina. Uno de estos diluyentes contiene citrato de sodio, leche en polvo y glicerina; la 10 movilidad de los espermatozoides es de 20 a 40% después de la congelación y descongelación del esperma en el diluyente anterior. Los resultados obtenidos con un diluyente a base de leche no son mejores que los obtenidos por 15 medio de diluyentes a base de lactosa.

COLAS y BRICE han descrito [Ann Zootech 1970, 19 (3) 353-357] un procedimiento para la conservación del esperma de carnero que consiste primero en diluir previamente a 30°C el esperma recogido de los carneros 20 en un diluyente sin glicerina del tipo propuesto por NAJASE y GRAHAM y diluir a continuación a 4°C el esperma diluido previamente en el mismo diluyente que contiene 10% de glicerina. El descenso de temperatura de 30 a 4°C se hace en dos horas. El tiempo de glicerolización 25 es de aproximadamente 2 horas, y el esperma así diluido



se congela en nitrógeno líquido. El porcentaje medio de partos es de aproximadamente 60%.

Ahora se ha descubierto un procedimiento de conservación del esperma de carnero por congelación que permite obtener después de descongelación un semen que proporciona resultados de partos constantes y elevados.

El procedimiento de conservación del esperma de carnero por congelación según el presente invento consiste en diluir el esperma de carnero recientemente recogido, primero entre 25 y 32°C, en particular a 30°C, en un diluyente sin glicerina a base de lactosa y de yema de huevo, y a continuación diluir entre 3 y 5°C, en particular a 4°C, la mezcla obtenida anteriormente, en un diluyente que contiene glicerina, conteniendo este diluyente esencialmente leche en polvo y citrato de sodio y en el que el esperma así diluido a continuación es acondicionado, de forma continua, en lentejas y congelado en nitrógeno líquido, a aproximadamente -75°C.

En la práctica el descenso de temperatura entre las dos etapas de dilución se realiza durante aproximadamente dos horas. Sin embargo, las duraciones indicadas pueden variar algo. Así, la separación entre las dos etapas de dilución puede llegar hasta tres ho-



20 16 1974

ras, aunque generalmente no sea de interés aumentar mucho esta duración. Es preferible, para una buena conservación del semen, no enfriar muy rápidamente después de la primera dilución, de modo que generalmente se eviten duraciones inferiores a dos horas. Preferiblemente, la segunda dilución se efectúa en la práctica en dos veces a intervalos de 20 minutos y el contacto del esperma diluido con el segundo diluyente dura entre 2 horas y 2 horas y media. Sin embargo, es igualmente posible realizar también la segunda dilución añadiendo la solución de glicerina de una vez al esperma diluido previamente. Al mismo tiempo el contacto con el segundo diluyente puede ser inferior a dos horas, y en este caso, los resultados obtenidos varían con la proporción de glicerina final. Por razones económicas, es inútil prolongar este tiempo de contacto más allá de 2,5 a 3 horas.

El diluyente sin glicerina empleado en la primera dilución del procedimiento según el invento, denominado a continuación "diluyente 101", es un diluyente a base de yema de huevo y de lactosa. Según el invento, el diluyente 101 contiene lactosa y preferiblemente hasta 20% (volumen/volumen) de yema de huevo. Se emplea ventajosamente según el procedimiento del invento un diluyente 101 que contiene 80% de una solución

20 Dic 1974

de lactosa al 10,3% (en peso por volumen) y 20% de yema de huevo (en volumen por volumen). Según el invento el diluyente 101 debe renovarse cada día y utilizarse a la temperatura de 30°C.

5 El segundo diluyente empleado en el procedimiento del invento y denominado a continuación "diluyente 102", es una solución concentrada de polvo de leche que contiene glicerina cuyo pH ha sido ajustado a un valor entre 6 y 7, ventajosamente a 6,60-6,65 con ayuda  
10 de una solución concentrada de citrato de sodio. Este diluyente se prepara ventajosamente a partir de un diluyente a base de leche en polvo utilizado generalmente para la conservación del esperma de ovino en estado líquido y denominado a continuación "diluyente L". Un  
15 procedimiento para la obtención del "diluyente L" está descrito por G. COLAS y otros ["Résultats obtenus au cours de l'étude de quelques facteurs importants de l'Insémination artificielle ovine Ann. Zootech. 1968, 17 (I), 47, 57"]. Este diluyente es una solución acuosa  
20 de polvo de leche que contiene aproximadamente 10,3% (peso/volumen); como polvo de leche, se utiliza por ejemplo el polvo de leche conocido con la denominación comercial "REGILAIT". Por las necesidades del invento, este diluyente L debe estar enriquecido en polvo de  
25 leche para convenir como segundo diluyente.



Según una variante preferida de empleo del procedimiento del invento, se prepara el diluyente 102 a partir del diluyente L que contiene 10,3% de polvo de leche, añadiendo a 100 ml de este "diluyente L", al menos 4 g de polvo de leche conocido con la denominación comercial REGILAIT, se ajusta el pH de la mezcla obtenida a 6,60-6,65 con ayuda de una solución concentrada de citrato de sodio, y se añade a continuación glicerina bidestilada en cantidad tal que la concentración final en glicerina del esperma diluido sea como máximo del 4% (volumen/volumen). Los ensayos in vitro mostraron que las concentraciones de glicerina próximas al 2% proporcionaban resultados ligeramente menos ventajosos y que una concentración del orden del 7% daba resultados claramente peores, que las concentraciones recomendadas que son del orden de aproximadamente 4%. El diluyente 102 según el invento debe utilizarse a 4°C y preferiblemente prepararse cada día. Según un modo de aplicación preferido de procedimiento del invento, el diluyente 102 contiene 10% en volumen de glicerina; el volumen del diluyente 102 añadido a 4°C, o volumen  $V_4$ , que hay que utilizar, se determina para que el volumen final  $V_T$  del esperma diluido contenga 4% y glicerina; los volúmenes  $V_4$  y  $V_T$  están pues relacionados en este caso particular por la relación



$V_4 = \frac{2}{5} V_T$ . El volumen  $V_T$  es función del volumen  $V_0$  del  
esperma puro y de las concentraciones  $C_0$  (concentración  
del esperma puro en espermatozoides) y  $C_f$  (concentración  
final); así se tiene  $V_T = \frac{C_0}{C_f} V_0$ . El volumen del diluyen  
te 101 añadido a 30°C, es decir  $V_{30}$ , es tal que cumpla  
5 la relación  $V_{30} = V_T - (V_0 + V_4)$ .

Será fácil para el experto en la técnica deter  
minar los volúmenes  $V_T$  y  $V_4$  que ha de utilizar en función  
de la concentración inicial en glicerina en el volumen  
10  $V_4$ , de  $V_0$ , de la concentración  $C_0$  y de la concentración  
 $C_f$  deseada. Se ha determinado según el invento que una  
concentración final de espermatozoides en el esperma dilui  
do particularmente ventajosa era de  $900 \times 10^6$  spz/ml. Los  
ensayos mostraron que concentraciones superiores a  $900 \times$   
15  $10^6$  spz/ml, por ejemplo de  $1200 \times 10^6$  y  $1500 \times 10^6$  spz/ml  
dieron índices de supervivencia menos ventajosos. Por el  
contrario, diluciones menores de  $900 \times 10^6$  spz/ml, por  
ejemplo  $600 \times 10^6$  spz/ml serían deseables, pero se está  
limitado por el volumen de la dosis de semen a inyec-  
20 tar, que no debe ser muy elevado en la oveja. Las concen  
traciones inferiores a  $900 \times 10^6$  spz/ml pueden sin embar  
go ser convenientes.

El descenso de la temperatura del esperma dilui  
do la primera vez de 30°C hasta 4°C se realiza generalmen  
25 te en aproximadamente dos horas como se ha indicado ante-  
riormente. La introducción del diluyente 102 se realiza



20 DIC 1974

a esta temperatura de 4°C. La experiencia ha mostrado, en efecto, que la incorporación de la glicerina a 30°C lleva consigo un descenso de fecundidad para los espermatozoides.

5                   Según el invento, la glicerolización, es decir la adición del diluyente 102, comienza aproximadamente 2 horas después de la primera dilución y preferiblemente se realiza en dos veces con 20 minutos de intervalo.

10                   El tiempo de contacto entre el esperma diluido y el diluyente 102 es del orden de dos horas a dos horas y media.

15                   La congelación del esperma diluido según el invento se realiza por la llamada técnica de congelación en lentes que consisten en acondicionar el esperma diluido en lentes, por ejemplo de un volumen útil de 0,45 ml y congelar dichas lentes sumergiéndolas horizontalmente en vapores de nitrógeno, a una altura que corresponde a una temperatura de aproximadamente -75°C. La duración de la inmersión es del orden de 8 minutos.

20                   El control de la calidad del esperma congelado puede comenzarse en el segundo día después de la congelación pero es deseable alcanzar unos 15 días. La calidad del esperma se controla en las condiciones siguientes: la temperatura de descongelación es de 35-38°C, la temperatura de incubación del esperma es igualmente de



+38°C; el medio de redilución del esperma descongelado es una solución acuosa de citrato de sodio 5,5 H<sub>2</sub>O (31,25 g de sal en un litro de solución). El semen recalentado se diluye a razón de 2 ml de solución de citrato para el contenido de una lenteja. La apreciación del porcentaje de espermatozoides vivos se determina en el microscopio de contraste de fase y tiene lugar de 0,1 a 3 horas después de la redilución igualmente a la temperatura de 38°C. Los ensayos mostraron que puede utilizarse cualquier eyaculado que tiene un porcentaje de espermatozoides vivos superior o igual al 45% inmediatamente después de la redilución a 38°C, superior o igual al 40% una hora después de la redilución y superior o igual al 30% tres horas después de la redilución. El esperma rediluido se mantuvo sin interrupción a la temperatura de 38°C. Los porcentajes de partos observados después de la inseminación artificial de ovejas en las condiciones habituales con ayuda del esperma de carnero congelado según el invento son siempre superiores al 50%, y pueden alcanzar el 70%.

Así, el invento proporciona un procedimiento que permite obtener porcentajes de parto superiores a los obtenidos con los procedimientos de la técnica anterior.

El presente invento se refiere igualmente al diluyente empleado en el procedimiento del invento

20310-1974

es decir el diluyente constituido por:

- 1) Un diluyente sin glicerina a base de lactosa y de yema de huevo.
- 2) Un diluyente con glicerina a base de polvo de leche y citrato de sodio.

5

El primer diluyente sin glicerina contiene preferiblemente 80% de una solución de lactosa al 10,3% (peso en volumen) y 20% de yema de huevo (en volumen por volumen).

10

El segundo diluyente se obtiene preferiblemente como se ha indicado anteriormente a partir del "diluyente L" a base de polvo de leche, por enriquecimiento en leche de dicho diluyente. El diluyente L, ya conocido, contiene 10 partes en peso de polvo de leche, 90 partes en volumen de agua destilada y 0,3 partes en peso de sulfamida. Al finalizar la preparación, se añaden 100 U.I. de penicilina y 0,1 partes en peso de estreptomycin. Este diluyente L y su modo de obtención están descritos en el artículo G. Colas (1968) antes citado.

15

20

El invento se refiere también al esperma de carnero diluido según el procedimiento descrito anteriormente y la solución del esperma de carnero diluida después de descongelación de dicho esperma de carnero diluido.

25

El invento permite también practicar la inseminación artificial inmediatamente después de la

20 DIC 1974

descongelación.

El invento se ilustrará con más detalle por los ejemplos siguientes que no tienen ningún carácter limitativo.

5

EJEMPLO 1

Se recogieron 1,5 ml de esperma de carnero de la especie Ile de France, los espermatozoides presentaban una movilidad de 4,7, la concentración del esperma puro era de  $4,2 \times 10^9$  spz/ml. El esperma así recogido se diluyó a 30°C en 2,7 ml de un diluyente 101 que contenía 10,3% de lactosa y 20% de yema de huevo. A continuación se enfrió la mezcla así obtenida hasta 4°C durante 2 horas. Se diluyó a continuación a 4°C, la mezcla anterior en 2,8 ml del diluyente 102 que contenía 14,3% de polvo de leche, 10% de glicerina y cuyo pH se ajustó a 6,6-6,65 con ayuda de una solución de citrato de sodio al 28,57%; el diluyente 102 se añadió en dos veces con intervalos de 20 minutos. Dos horas después de la primera adición del diluyente 102, se procedió al acondicionamiento en lentejas del esperma diluido de 0,45 ml de volumen útil y a la congelación en las condiciones habituales en los vapores de nitrógeno líquido entre -70 y -80°C. Se controló la calidad del esperma congelado 15 días después de la congelación. El esperma se descongeló a 38°C; el medio de redilución era una

10

15

20

25



solución acuosa de citrato de sodio 5,5 H<sub>2</sub>O al 31,25 por mil. Se diluyó cada lenteja con 2 ml de la solución de citrato anterior y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos 0, 1, 3 horas después de la redilución. Los resultados obtenidos están indicados en la tabla siguiente.

	tiempo transcurrido después de la redilución -en horas	% de espermato- zoides vivos
10	0	50
	1	40
	3	32,5

#### EJEMPLO 2

Se inseminaron artificialmente durante el mes de Octubre ovejas de la raza Ile de France con el espermatozoides conservado por congelación según el ejemplo 1. Las ovejas se trataron por vía hormonal (esponja vaginal impregnada de 40 mg de acetato de fluorogestona-400 UI de PMSG el día de retirada de la esponja. Se efectuaron dos inseminaciones por oveja 50 y 60 horas después de la retirada de la esponja. Se obtuvieron 60% de partos.

#### EJEMPLO 3

En este ejemplo, se estudió la influencia de

20 DIC 1974

la concentración final de glicerina en el esperma diluido. Se prepararon dos diluyentes 102 como el ejemplo 1, uno contenía 10% de glicerina y el otro 5% de glicerina. La dilución del esperma de carnero recientemente recogido se efectuó en las mismas condiciones que en ejemplo 1 con ayuda de dos diluyentes. Las proporciones de glicerina en los espermias diluidos eran pues del 4% por una parte y del 2% por otra parte. 91 ovejas de la misma selección se inseminaron como en el ejemplo 2 con el esperma diluido que contenía 2% de glicerina y 79 ovejas de la misma selección se inseminaron en las mismas condiciones con el esperma diluido que contenía 4% de glicerina. Los porcentajes de parto obtenidos son los siguientes:

15	<u>Proporción de glicerina contenida en el esperma diluido</u>	<u>% de partos</u>
	2%	38,5%
	4%	55,7%

20 Este ensayo muestra que es ventajoso utilizar una proporción de glicerina en el procedimiento según el invento de aproximadamente 4%.

#### EJEMPLO 4

25 Se inseminaron por una parte 34 ovejas de la misma selección con esperma de carnero diluido según el



invento preparado como en el ejemplo 1 y por otra parte  
45 ovejas de la misma selección con esperma de carnero  
diluido de las mismas condiciones que en el ejemplo 1,  
pero utilizando como segundo diluyente, es decir como  
5 diluyente con glicerina, en lugar del diluyente 102, un  
diluyente conocido que contenía 11,75% de lactosa, 10%  
de glicerina y 20% de yema de huevo. Los porcentajes  
de partos obtenidos con el diluyente según el invento  
fueron de 73,5% mientras que con el esperma diluido co-  
10 nocado el porcentaje de parto no era mas que de 42,2%.

Este ejemplo muestra que los resultados obte-  
nidos con un segundo diluyente que, de acuerdo con el  
invento, está enriquecido en leche, son más ventajosos  
que con diluyente clásico sin leche.

15

#### EJEMPLO 5

En este ejemplo se comparó in vivo, el diluyen-  
te según el presente invento con un diluyente que prove-  
nía del centro "International Genes", 1935 - West County  
20 Road B-2 - St Paul Minnesota 55-113 EE.UU.

Se inseminó un grupo de ovejas con el diluyen-  
te según el invento y otro grupo de la misma selección  
se inseminó con el diluyente citado anteriormente. Los  
ensayos se efectuaron durante el celo natural y el celo  
25 sincronizado.



Los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente:

Anexo 1

		Celo natu- ral	Celo sin- cronizado	Media
5	Esperma diluido según la técnica anterior	Fertilidad 59,0 (56) (% M.B.)	52,0 (96)	55 (152)
10		Prolifici- dad (% agn. M.B.) 163	180	173
	Esperma diluido según el invento	Fertilidad 68 (60)	75,0 (94)	73 (154)
15		Prolifici- dad 185	200	193

EJEMPLO 6

En este ejemplo la glicerolización, es decir la adición del diluyente 102, al esperma diluido a 30°C con el diluyente 101 según el invento, se efectuó por una parte a 30°C y por otra parte según el invento es decir a 4°C, siendo las otras condiciones empleadas en el procedimiento de dilución idénticas a las del ejemplo 1. Se inseminaron 23 ovejas como en el ejemplo 1 con el diluyente según el invento y 23 ovejas de la misma selec-



20 DE 1974

5 ción se inseminaron con el esperma diluido y glicerolizado a 30°C. Los porcentajes de gestación observados fueron de 35% con el diluyente glicerolizado a 30°C y de 48% con el diluyente glicerolizado a 4°C. Estos resultados muestran que cuando la glicerolización se efectúa a 4°C los porcentajes de gestación son más elevados.

EJEMPLO 7

10 En este ejemplo se trabajó como en el ejemplo 1, utilizando esperma de carnero no seleccionado por la movilidad de los espermatozoides, utilizando como segundo diluyente por una parte el "diluyente L" no enriquecido en leche y por otra parte el diluyente 102  
 15 según el invento. La media de los porcentajes de espermatozoides vivos 0, 1, y 3 horas después de la descongelación es en el caso en que el segundo diluyente es el diluyente L de 19,2 % y en el caso del diluyente 102 de 25,9%. Este ejemplo muestra que el diluyente 102, según el invento, es más ventajoso que el diluyente L no  
 20 enriquecido, aun para la congelación de eyaculados no seleccionados antes de la dilución.

25 La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Francia, el 18 de Diciembre de 1973, bajo el número 73 45.351, se acoge a los beneficios del Artí



20 DIC. 1974

culo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

- REIVINDICACIONES -

10

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Procedimiento de conservación del esperma de carnero por congelación que consiste en diluir el esperma recientemente recogido en un diluyente sin glicerina y a continuación en un diluyente con glicerina, caracterizado porque se diluye el esperma en un diluyente sin glicerina a base de lactosa y de yema de huevo, porque se diluye a continuación la mezcla así obtenida en un diluyente con glicerina a base de polvo de leche y de citrato de sodio, y porque el esperma así diluido se acondiciona en lentejas y se congela, de forma conocida a aproximadamente  $-75^{\circ}\text{C}$ .

20

25

13.12.74

- 20 -



20 DIC 1974

5 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el diluyente a base de lactosa y de yema de huevo contiene lactosa preferiblemente hasta 20% de yema de huevo, y porque el segundo diluyente es una solución acuosa concentrada de polvo de leche que contiene glicerina cuyo pH se ha ajustado a un valor comprendido entre 6 y 7 preferiblemente 6,60-6,65 con ayuda de una solución de citrato de sodio.

10 3ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1ª o 2ª, caracterizado porque la primera dilución se efectuó a una temperatura comprendida entre 25 y 32°C, preferiblemente a 30°C, y porque la segunda dilución se efectuó a una temperatura comprendida entre 3 y 5°C preferiblemente a 4°C.

15 4ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado porque el descenso de temperatura entre la primera y la segunda dilución se realiza durante 2 a 3 horas, preferiblemente durante 2 horas.

20 5ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado porque la segunda dilución se efectúa en dos veces en un intervalo de 20 minutos.

25 6ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque la conge-

13.12.74





20 DIC 1974

lación comienza aproximadamente dos horas a dos horas y media después de la primera adición del diluyente con glicerina.

5 7ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque la cantidad de glicerina en el segundo diluyente es tal que la concentración final de glicerina en el esperma diluido sea como máximo 4%.

10 8ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 7ª, caracterizado porque el diluyente a base de lactosa y de yema de huevo contiene 80% de una solución de lactosa al 10% (en peso por volumen) y 20% de una solución de yema de huevo (volumen por volumen) y porque el segundo diluyente se obtiene a partir  
15 del "diluyente L" que contiene 10,3% de polvo de leche, añadiendo a 100 ml de este diluyente al menos 4 g de polvo de leche, ajustando el pH de la solución así obtenida a 6,60-6,65 con ayuda de una solución concentrada de citrato de sodio, siendo la cantidad de glicerina  
20 utilizada en este diluyente de 10% en volumen.

25 9ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 8ª, caracterizado porque el diluyente a base de lactosa y de yema de huevo contiene 80% de una solución de lactosa al 10,3% (en peso por volumen) y 20% de una solución de yema de huevo (volumen

20 DIC 1974

5 por volumen) y porque el segundo diluyente se obtiene a partir del "diluyente L" con aproximadamente 10,3% de polvo de leche, conteniendo dicho diluyente L 10 partes en peso de polvo de leche, 90 partes en volumen de agua destilada y 0,3 partes en peso de sulfamida así como, con relación a la composición así definida, 100 UI de penicilina y 0,1 partes en peso de estreptomici-  
10 na, habiéndose sido obtenido dicho segundo diluyente añadiendo a 100 ml de diluyente L al menos 4 gramos de polvo de leche, y ajustándose el pH de la solución así obtenida a 6,60-6,65 con ayuda de una solución concentrada de citrato de sodio, siendo la cantidad de glicerina utilizada en este diluyente de 10% en volumen.

15 10ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACION DEL ESPERMA DE CARNERO POR CONGELACION.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintitrés hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

20 DIC. 1974

P.A.

Fernando de Elizaburu  
Por Poder

  
PGC

13.12.74