

O. 7114



PATENTE DE INVENCION

Grupo 4º, Clase 40ª

325 199

MEMORIA DESCRIPTIVA

sobre:

"UN METODO PARA CONTROLAR EL SEXO EN LA DESCENDENCIA DE
MAMIFEROS, Y APARATO PARA LA REALIZACION DE ESTE METODO"

Solicitante: SWB RESEARCH CORPORATION,
una sociedad constituida de acuerdo
con las leyes del Estado de California,
establecida en
SAN FRANCISCO, California,
Estados Unidos de América,
320 Judah Street.

Prioridad: Solicitud de Patente Ser. N° 443.473,
depositada en los Estados Unidos de América
en 29 de Marzo de 1965.

325199



La presente invención se refiere en general a un método para controlar el sexo en la descendencia de mamíferos, y a un aparato para la realización de este método. Más particularmente, la invención se relaciona con la separación de espermatozoides que contienen cromosomas X de los espermatozoides que contienen cromosomas Y.

Se ha descubierto que el sexo de la descendencia queda determinado por los cromosomas de los espermatozoides o células de espermatozoides o células de espermatozoides que han fecundado el óvulo. Ello significa, que algunos de los espermatozoides (llamados a continuación "espermatozoides") se distinguen genéticamente por contener cromosomas X, o femeninos, mientras que otros contienen cromosomas Y, o masculinos. En el microscopio, los cromosomas X aparecen de tamaño mayor que los cromosomas Y. Cuando se une una espermatozoide conteniendo cromosomas X (denominada a continuación espermatozoide X) con el óvulo (que contiene cromosomas X), resulta una descendencia femenina. Cuando se une una espermatozoide conteniendo los cromosomas Y (denominada a continuación espermatozoide Y) con el óvulo, resulta una descendencia masculina. La población de espermatozoides en la eyaculación de un mamífero macho contiene tanto espermatozoides X como espermatozoides Y. Hasta ahora no ha sido lograda satisfactoriamente la separación de dichas espermatozoides en los componentes X e Y. Es evidente, sin embargo, que la separación de ambas clases de espermatozoides permitiría una elección o selección del sexo definitivo de la descendencia.

325 199

26



En general, constituye una finalidad de la presente invención el proporcionar un método realmente eficaz para controlar el sexo en la descendencia de mamíferos.

5 Otra finalidad de la presente invención consiste en proporcionar un método para la obtención de una separación substancialmente completa entre espermatozoides X y espermatozoides Y capaz de producir una fecundación normal en el eyaculado de un mamífero.

10 Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar una composición nueva capaz de producir una descendencia de mamíferos del sexo deseado.

15 Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar nuevos medios para la separación de espermatozoides X de espermatozoides Y capaz de producir una fecundación normal.

Otros objetivos y ventajas de la invención se desprenderán de la siguiente descripción en la que se exponen en detalle algunas formas de realización preferentes en relación con los dibujos adjuntos.

20 Es bien conocida la amenaza de un rápido crecimiento de la población humana y de una sobre-población eventual. Es también conocido que un fuerte incentivo en la procreación humana es el deseo de tener una descendencia de un sexo determinado. En el caso de no obtenerse el
25 sexo deseado, se concibe más descendencia. La presente invención permite a los matrimonios elegir o controlar el sexo de la descendencia y proporcionar con ello la oportunidad de reducir el número de hijos al quedar cum-



plido el deseo de tener un hijo de un sexo determinado. Además, la invención resulta útil en la aplicación a animales domésticos, permitiendo una elección en la selección del sexo de la descendencia según las finalidades que se persigan.

La presente invención tiene un gran campo de aplicación en la solución de los problemas alimenticios en el mundo hambriento, por cuanto:

- 1º reduce el número de nacimientos humanos; y
- 2º aumenta la producción de proteínas alimenticias animales en un programa selectivo de producción de una mayoría de existencias vivas del deseado sexo.

Con referencia a los dibujos:

La Fig. 1 representa un cuadro de las sucesivas fases del método de la invención;

la Fig. 2 es una representación esquemática del proceso en determinados momentos de su desarrollo;

la Fig. 3 es un diagrama que ilustra la separación de una típica población de espermas en los componentes de diferente sexo;

la Fig. 4 es una vista en sección y de alzado de un aparato adaptado para la realización del método según la presente invención;

la Fig. 5 es una vista en sección según la línea 5-5 de la Fig. 4;

la Fig. 6 es una vista en sección según la línea 6-6 de la Fig. 4;

325199

26



la Fig. 7 representa una vista de detalle, a escala ampliada, de una porción del aparato ilustrado en la Fig. 4; y

las Figs. 8 a 10 son diagramas que ilustran ejemplos
5 específicos de la separación de espermias llevados a cabo según la presente invención.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los dos genotipos de espermias de mamíferos (X e Y) pueden ser separados de acuerdo con las características
10 fenotípicas aplicando una fuerza ascensional que origine que las espermias más ligeras alcancen un diferente nivel en determinado medio que las espermias más pesadas. La fuerza ascensional puede ser tanto positiva, haciendo ascender a los cuerpos, como negativa, haciendo descender
15 a los cuerpos en el medio. Como ejemplo específico de una fuerza ascensional, puede considerarse la fuerza de gravedad como una fuerza ascensional negativa que separa las espermias por sedimentación. Se ha encontrado que la sedimentación a bajas temperaturas en un medio de propiedades escrupulosamente controladas da lugar a la separación de las espermias X de las espermias Y.
20

Cuando una partícula inerte desciende a través de un medio, tal descenso se realiza según la ley de Stokes, considerando la velocidad de sedimentación influenciada
25 por la acción sobre ella de las fuerzas físicas tales como el empuje del líquido, la viscosidad del líquido, la fuerza de gravedad, y la diferencia de densidad entre el medio y las partículas. En deducción de la ley de

325199

26



Stokes, se ha encontrado que:

$$v = \frac{K(p - p')mg}{3pw}$$

- 5 significando: v = velocidad de la partícula (cm seg^{-1})
 p = densidad de las partículas (g cm^{-3})
 p' = densidad del medio (g cm^{-3})
 m = masa de la partícula (g)
 g = aceleración de gravedad (981 cm seg^{-2})
 w = tensión superficial (g cm^{-2})
10 K = constante de las partículas para la
forma geométrica de las mismas.

Según la ley de Stokes, la velocidad de la partícula descendente varía con el tamaño y la forma de la partícula y la diferencia de densidad entre el medio y la partícula. Cuando la velocidad de descenso en una clase de partículas sigue la ley de Stokes, se obtiene una distribución normal de Gauss de la población, en la que las partículas de igual densidad e igual volumen se hallan contenidas en las diversas fracciones de sedimentación.

20 Se ha encontrado que bajo condiciones cuidadosamente controladas, los sedimentos de espermas en una columna de medio y las fracciones más altas y las más bajas, al ser inseminadas, producen diferentes relaciones de sexo. Las diferencias fenotípicas observadas en la esperma se hallan en relación con sus genotipos sexuales.

25 La Fig. 1 muestra las sucesivas fases del proceso de la presente invención. En la fase 11, esperma fresca es recogida del macho, conteniendo esta esperma iguales

325199 26



cantidades de esperma X y esperma Y. Esta esperma es mezclada con un medio nutritivo en la fase 12. El medio nutritivo es absorbido por la esperma en la fase 13, después de la cual la mezcla es refrigerada gradualmente en la fase 14. Una vez enfriada, la mezcla es sometida a sedimentación en la fase 16. Las fracciones sedimentadas son separadas a continuación en la fase 17 para aislar las espermas X o las espermas Y, según se desee. La esperma que contenga los deseados cromosomas, en combinación con la mezcla nutritiva, es inseminada a continuación artificialmente en la fase 18 en la hembra de la especie de la que se obtuvo la esperma. Naturalmente, el caballo puede cruzarse con el asno y la cebra, como también el lobo con el perro.

La presente invención es aplicable para todos los mamíferos. De particular interés son los seres humanos y otros cuadrúmanos, ganado, cerdos (es decir puercos y jabalíes), ovejas, conejos, gatos, cabras, caballos, asnos y búfalos. Ha sido comprobado que en todos ellos existe una diferencia de densidad entre las espermas X y las espermas Y, poseyendo las espermas X una mayor densidad que las espermas Y. En un jabalí, la diferencia de densidad entre los cromosomas X e Y es de un 18%. En toros y caballos sementales, la diferencia de densidad es de un 10%. En varones, el cromosoma X es un 5% más denso que la esperma Y. En conejos, la diferencia es aproximadamente de un 3%.

El medio elegido para ser empleado en la fase 12

325 199

26



debe tener una densidad lo suficientemente parecida a la de la esperma, de modo que la ligera diferencia de densidad entre las espermas X y las espermas Y produzca una sedimentación en diferentes fracciones. En relación con

5 la densidad, la viscosidad debe ser también apropiada para controlar la sedimentación. Adicionalmente, el medio no debe perjudicar el poder de fecundación de la esperma. Ello significa que el medio no debe perjudicar o destruir la esperma. Por el contrario, el medio debe ser

10 nutritivo para mantener viva la esperma. Las espermas X, que son relativamente más grandes que las espermas Y, absorben selectivamente una mayor cantidad de medio. El medio debe también poseer un pH apropiado (es decir, del orden de 6.0 a 6.8) para permitir que actúe de regulador.

15 Un pH fuera del orden de 6.0 a 6.8 tiende a afectar la fecundidad de las espermas o resultar incluso tóxico. Una consideración final del medio consiste en que éste debe tener las características del líquido normal del cuerpo. Ello significa que la presión osmótica, o la

20 osmolaridad, debe ser alrededor de 300 mm de mercurio, de modo que las espermas no revienten ni sean comprimidas. A través de toda la descripción y las reivindicaciones, los valores del pH, de la densidad y de la viscosidad se entienden a 20°C.

25 Un medio nutritivo altamente satisfactorio lo constituye una combinación de yema de huevo y glicina. La yema de huevo posee sustancias nutritivas permeables a las espermas y que son absorbidas por éstas, tales como

325199

26



glucosa, fructosa y amino ácidos. La yema de huevo presenta también un pH (alrededor de 6.2 a 6.8), viscosidad y densidad apropiados, y es un líquido normal del cuerpo, lo que hace que resulte apropiada para utilizarla generalmente como medio. Los valores específicos de densidad, viscosidad, osmolaridad y pH deseados pueden ser obtenidos mezclando la yema de huevo con glicina antes del uso. La densidad de la yema de huevo en sí debe de ser lo más alta posible para una sedimentación óptima. Se ha comprobado que la adición de aceite de semillas de algodón a la comida de las gallinas y la selección de una raza apropiada (por ejemplo Leghorn) aumenta la densidad de la yema de huevo.

La leche fresca de los mamíferos (particularmente leche homogeneizada) y los derivados de la misma (por ejemplo leche en polvo) pueden utilizarse, en sustitución de la yema de huevo, como sustancias nutritivas y para favorecer la fecundidad, pero la densidad debe ser controlada para que resulte adecuada. Otros substitutivos de la yema de huevo son jugo de tomate, crema de coco, derivados de cocos verdes, extractos y flúidos de cuerpos vivos, y extractos de tejidos (por ejemplo extracto de hígado). Alternativamente puede utilizarse dextran en combinación con lecitina como substitutivo de la yema de huevo. El dextran asegura la densidad, viscosidad y pH, y la lecitina sirve de sustancia nutritiva. Adicionalmente pueden usarse fructosa, glucosa y otros monosacáridos para proporcionar un medio nutritivo

325199

26



apropiado.

La glicina se emplea preferentemente en una solución acuosa de un 2-5% de glicina, sirviendo la misma para regular el pH del semen y para disminuir el punto
5 de congelación del medio con el fin de evitar un cambio brusco de temperatura. La relación entre la glicina y la yema de huevo depende de la temperatura, densidad, viscosidad y osmolaridad de la mezcla de yema de huevo. La solución de glicina tiene una viscosidad más baja
10 que la yema de huevo, de modo que se utilizará tanto mayor cantidad de ella cuanto menor tenga que ser la viscosidad. Generalmente se necesita únicamente una parte de glicina al 4% para cada 1 a 4 partes de yema de huevo.

La glicina es probablemente absorbida selectivamente del medio por la esperma y tiende a aumentar la velocidad de descenso de la esperma. Como las espermias X son mayores que las espermias Y, aquéllas absorben una mayor cantidad de glicina que éstas. En consecuencia, la diferencia de densidad entre las espermias X y las espermias
15 Y queda acentuada por la absorción de glicina en condición ligeramente hipotónica. Ello significa que existe una mayor diferencia de densidad entre ambos tipos cuando son densificados artificialmente por medio de la absorción de glicina.
20

De acuerdo con otra variante, la glicina puede ser substituída por el glicerol en el medio nutritivo. Otros aminoácidos, tales como triptófano, pueden ser utilizados con resultados satisfactorios.
25

325 199 26



Para resultados óptimos, la densidad del medio nutritivo debe variar según la especie de mamífero de la que se han obtenido las espermatozoides. Para los seres humanos, así como para los conejos, la densidad debe variar entre 5 1.01 y 1.19 gramos aproximadamente por centímetro cúbico. En el límite inferior de dicha densidad, gran parte de las espermatozoides descienden a través de la mezcla, de modo que las fracciones más bajas resultan ser mezclas de espermatozoides X y espermatozoides Y. Sin embargo, las fracciones superiores contienen una pequeña cantidad de espermatozoides Y 10 separadas. En los límites superiores de la gama de densidades, unas pocas espermatozoides descienden a través del medio, de modo que las fracciones superiores contienen una mezcla de espermatozoides X y espermatozoides Y. Por encima de 1.19 son 15 separadas únicamente espermatozoides X. En una densidad de 1.34 no se produce sedimentación alguna y todas las espermatozoides flotan en el medio. Con el fin de lograr una separación completa entre las espermatozoides X y las espermatozoides Y, se necesita generalmente una densidad del medio de alrededor 20 1.026, tanto para toros como para seres humanos. Sin embargo, esta cifra varía con la viscosidad, temperatura y otras condiciones. Cuanto más se acerca la densidad del medio a la densidad media de las espermatozoides, tanto mejores son los resultados. Por otra parte, el medio no debe ser 25 tan denso que quede impedida la sedimentación. En el caso de que la densidad se acerque a la de las espermatozoides más ligeras, la viscosidad resulta relativamente sin importancia y puede ser tan baja como pueda obtenerse, por ejem-

325199

26



plo inferior a 1.0 poise.

La tabla 1 muestra la gama de densidades y viscosidades de varias especies de mamíferos, indicando el límite inferior de densidad y viscosidad para una separación satisfactoria, y el límite superior para una sedimentación satisfactoria. Todas las mediciones realizadas en la Tabla 1 han sido efectuadas a 20°C, con la densidad en gramos/cc y la viscosidad en poise.

TABLA 1

	<u>Densidad</u>		<u>Viscosidad</u>	
	<u>Baja</u>	<u>Alta</u>	<u>Baja</u>	<u>Alta</u>
Humanos	1.022	1.09	0.02	1.2
Conejos	1.022	1.09	0.02	1.2
Toros	1.023	1.10	0.07	3.0
Cerdos	1.03	1.15	0.07	3.0

La viscosidad del medio está en relación con la densidad. Para humanos y conejos, una densidad de 1.02 gramos por cc corresponde a una viscosidad de aproximadamente 1.00 poise. La densidad superior de 1.09 corresponde a aproximadamente 0.075 poise. El límite superior de densidad aplicable a humanos y conejos, 1.19 gramos por cc, corresponde a aproximadamente 0.05 poise.

La presión osmótica del medio debe variar entre un límite inferior de aproximadamente 270 y un límite superior de aproximadamente 330 milímetros de mercurio.

325 199

26



La absorción del medio por la esperma, fase 13, se realiza preferentemente durante un período de unos 15 minutos. Aunque es posible comenzar la refrigeración de la mezcla sin período de absorción apreciable alguno, resulta generalmente conveniente prever un corto período de absorción a temperatura de ambiente. La mezcla de esperma y medio puede ser mantenida a temperatura de ambiente hasta tres horas para permitir la absorción. Probablemente se produce una absorción selectiva de substancias permeables, tales como glicina, glicerina y fructosa a temperaturas de ambiente. Aumentando el período de absorción por encima de los 15 minutos normales, es alterada la velocidad de sedimentación. Ello significa que las espermias X mayores absorben mayor cantidad del medio y descienden a mayor velocidad que las espermias Y o las espermias X que no han absorbido tanta cantidad del medio denso.

Después de haber sido absorbido el medio por las espermias, la mezcla es refrigerada gradualmente para inmovilizar las espermias. Con un equipo convencional de refrigeración resulta conveniente prever cuatro horas para alcanzar una temperatura inferior a 1.0°C . No obstante, con equipos de refrigeración rápida, este período de tiempo puede ser reducido a sólo unos cuantos minutos. En consecuencia deben ser previstos de 1 a 300 minutos aproximadamente para permitir la refrigeración de la mezcla a una temperatura por debajo de 1.0°C . Después de alcanzar dicha temperatura, la mezcla es mantenida du-

325199

26 MAR 1966



rante 15 horas a dicha temperatura baja.

El tiempo fijado para llevar a cabo la fase 16 de sedimentación puede variar considerablemente. Con medios de densidad relativamente baja, las partículas descienden de manera relativamente rápida, de modo que se requiere un tiempo de sedimentación menor. Por el contrario, medios densos y viscosos tienden a disminuir el descenso de las partículas inertes, de modo que se requieren períodos de tiempo relativamente largos para la sedimentación. Generalmente se necesitan de 1 a 24 horas para lograr una sedimentación apropiada.

Con referencia a la Fig. 2, el tiempo de sedimentación debe ser tal, que las dos fracciones queden substancialmente separadas tal como se ilustra en el tiempo 12. En el tiempo 0 están mezcladas entre sí las espermias X (representadas por ♀) y las espermias Y (representadas por ♂) al entrar la mezcla refrigerada en la columna de sedimentación. Después de varias horas, por ejemplo 4 horas según la forma de realización particular ilustrada, las espermias X de mayor densidad han empezado a separarse de las espermias Y de menor densidad en el descenso a través de la columna de sedimentación. Tanto las espermias X como las espermias Y descienden, pero las espermias X descienden a mayor velocidad. En el tiempo 12 según el ejemplo ilustrado, se produce la separación substancialmente completa entre las espermias X y las espermias Y. En este punto debe ser interrumpida la sedimentación y separarse las fracciones. Si las fracciones

325199

26



no son separadas en el momento apropiado, se vuelven a mezclar al acercarse al fondo de la columna de sedimentación, tal como se ilustra en el tiempo 30.

5 Si se emplea un tiempo insuficiente para la sedimentación, el descenso es tan lento que únicamente se produce una pequeña separación entre las fracciones de espermas X y espermas Y. Si se emplean más de 24 horas para la fase de sedimentación, el medio mismo tiende a separarse. Esto es, los iones inorgánicos y otras partículas
10 pesadas en el medio coloidal se separan después de largos períodos de tiempo. Además, las partículas del medio se precipitarán del fluido si se emplean substancialmente más de 24 horas.

15 Para una separación más completa de las fracciones, sin separación adversa del medio, se emplean preferentemente de 9 a 18 horas para la fase de sedimentación, en dependencia de las especies de animales y del tipo del medio. Para humanos, 12 horas aproximadamente resultan óptimas para una sedimentación apropiada, siendo el
20 medio yema de huevo.

Según el medio empleado se requiere una temperatura entre aproximadamente -5.0°C y 1.0°C . Por debajo de esta gama de temperaturas, las propiedades físicas del medio quedan alteradas de tal modo que no resulta una sedimentación apropiada. A temperaturas más elevadas, las
25 espermas tienden a nadar o a moverse por sí mismas en el medio, lo que impide la separación como partículas inertes libremente descendentes en la fase de sedimentación.

325199

26



En consecuencia, la temperatura preferente para un medio de yema de huevo y glicina es de 0.0°C .

5 Durante el proceso, debe tomarse la precaución de evitar excesiva vibración. Una agitación violenta tiende a romper las colas de las espermias. Además, durante la fase de sedimentación, incluso una ligera vibración afecta el descenso de las espermias de modo que no pueden actuar como partículas inertes. Por otro lado, una ligera vibración tiende a favorecer la sedimentación. Particular atención se requiere durante la separación de las fracciones para evitar vibración y contaminación con fracciones adyacentes. A este fin resulta deseable efectuar la separación gota a gota con intervalo aproximado de 1-2 segundos por gota. Después de la separación de una fracción, la mezcla restante debe dejarse reposar durante un período por lo menos tan largo como el período utilizado para la separación de la fracción. Así, si se requieren 45 segundos para la separación de una fracción, debe dejarse pasar otro período de 45 segundos antes de separar la siguiente fracción.

20 Otro factor que debe tomarse en consideración es el evitar luz visible. La luz afecta la fecundidad de las espermias, haciéndoles perder su eficacia en la perforación de la cubierta protectora de un óvulo. La fecundidad puede también quedar afectada por un pH extremadamente alto o bajo del medio (fuera de la gama de 6.0 a 6.8 para la mayoría de las especies), por la edad de las espermias y por el número de espermias movibles.

325 199

26



Las fracciones separables en la fase 17 contienen cantidades variables de espermas X y de espermas Y. Tal como se representa en la Fig. 3, que es típica para las condiciones actualmente logradas con cada una de las especies de mamíferos mencionadas más arriba, resulta posible una separación substancialmente completa entre las espermas X y las espermas Y y la misma se ha obtenido según el método de la presente invención. (Véase los ejemplos específicos). Así, en la Fig. 3, que se refiere a espermas humanas, la fracción entre 1 y 3 contiene substancialmente todas las espermas X. La fracción entre 14 y 23 contiene substancialmente todas las espermas Y. Una fracción apropiada para realizar la presente invención debe poseer por lo menos un 60% de espermas X o de espermas Y (de acuerdo con la selección) para superar la relación 50-50 existente en la naturaleza. Para fines comerciales, por lo menos un 75% de las espermas deben ser del sexo deseado, para que el coste de realización del presente método no resulte prohibitivo.

Preferentemente, por lo menos un 90% de las espermas deberían ser de un mismo tipo, con el fin de reducir la posibilidad de obtener una descendencia del sexo opuesto a un margen estadísticamente tolerable. Naturalmente, una separación de un 100% sería lo ideal, puesto que quedaría descartada toda posibilidad de error. Tal separación completa asegura que si se produce una concepción, la descendencia será del sexo deseado. Cuando se logra una separación substancialmente completa, tal

325 199



como en la Fig. 3, cada fracción consiste esencialmente de espermas que contienen únicamente los cromosomas deseados.

5 Un nuevo aparato especialmente adaptado para la realización del método anteriormente descrito se ilustra en las Figs. 4 a 6.

10 Tal como se ilustra en la Fig. 4, una columna 21 está prevista para permitir la sedimentación de la mezcla de espermas y medio. Un mecanismo de alimentación apropiado, indicado en 22, está previsto para introducir la mezcla de espermas y medio en la columna. La columna 21 puede consistir en un cilindro exterior 23 de cristal provisto de un cierre o tapón 24 en el extremo superior. El extremo inferior del cilindro 23 puede estar 15 soportado por un tapón doble 26 que sirve también de cierre de una cámara colectora 27 dispuesta en la parte inferior de la columna.

20 Dispuesta en el interior del cilindro 23 se encuentra una cámara o probeta de sedimentación 28, en la que es introducida la mezcla mediante el mecanismo de alimentación 22. Se ha encontrado que una probeta de cristal de 1.5 cm de diámetro y 15 cm de longitud resulta altamente satisfactoria. La probeta está provista de un grifo de cierre 29 en el extremo inferior de la misma 25 para permitir la extracción de las fracciones. En la forma de realización ilustrada, las fracciones son extraídas a un vaso 31. La cámara colectora 27 sirve de recinto cerrado que protege el aparato durante la sepa-

325199

26



ración o drenaje de las fracciones de la probeta 28 al vaso 31.

Con el fin de evitar una turbulencia en las fracciones después de la sedimentación, la probeta 28 está provista de un estrechamiento cónico 35. Las probetas convencionales tienen una curvatura relativamente brusca inmediatamente por encima del grifo de cierre. Una estructura semejante produce turbulencias y contracorrientes en las fracciones de sedimentación, que se traducen en una contaminación de las fracciones adyacentes y en una mezcla de espermias X con espermias Y. La estructura mejorada según se ilustra en la Fig. 4, posee paredes cónicas 35 en la probeta 28, de modo que todo mezclado y contaminación por turbulencia quedan impedidos.

Preferentemente, según se ilustra en la Fig. 7, la abertura en el grifo de cierre 29 y la base estrechada de la porción cónica 35 tienen exactamente el mismo diámetro, de modo que no se produce obstrucción alguna en el flujo hacia el grifo de cierre. La conicidad de la porción 35 de la base de la probeta se continúa, según una forma preferente de realización, a través del grifo de cierre 29, de modo que la disminución del diámetro es gradual. De este modo, el orificio en el grifo de cierre tiene la forma de cono truncado. El diámetro del orificio superior en el grifo de cierre 29 es preferentemente dos veces mayor que el diámetro del orificio inferior.

Se ha dispuesto una manilla alargada 32 en el grifo



de cierre 29 para hacer posible la salida de la misma a través de un orificio 33 en la pared de la cámara de protección 27. El grifo de cierre, por tanto, puede ser manipulado cuando el vaso 31 se encuentra alojado en la cámara 27. Después de la recogida de una fracción separada en el vaso 31, puede extraerse dicho vaso de la cámara a través de una abertura apropiada 34 (Figs. 4 y 6).

Para mantener la mezcla de sedimentación a la baja temperatura requerida, se halla dispuesta una cantidad de hielo 40 en el interior del cilindro exterior 23, alrededor de la probeta 28. Tal como se ilustra en las Figs. 4 y 5, esta disposición asegura que la mezcla de espermas y medio dispuesta dentro de la probeta 28 quede mantenida a la temperatura deseada.

Para la utilización del aparato se introduce una mezcla previamente refrigerada de espermas frescas y de medio en el mecanismo 22, ilustrado en forma de pequeña pipeta, traspasándola a la probeta 28, que a su vez es llenada con medio. Las espermas, de mayor densidad que el medio circundante, tienden a descender o sedimentarse a través del medio. Según la ley de Stokes, las espermas X de mayor densidad descienden a mayor velocidad que las espermas Y de menor densidad, con el resultado de que se produce una separación entre las espermas X y las espermas Y. Pequeñas fracciones del medio son extraídas de la probeta 28 a través del grifo de cierre 29, recogiénolas en el vaso 31. Cada fracción es examinada para determinar el número de espermas con el fin de en-

325 199

26



contrar las fracciones que contengan las espermias X y las fracciones que contengan las espermias Y.

Según una variante de realización, pueden ser introducidas en la probeta medios para la medición de la densidad, tales como una pluralidad de pequeños hidrómetros, para determinar la posición de las diferentes fracciones que contienen espermias X y espermias Y a su paso a través de la columna. Esta forma de realización evita la necesidad de extraer pequeñas fracciones y de examinar cada una de ellas.

Utilizando leche o un fluido del cuerpo como medio, la determinación de la posición de las capas sedimentadas sin necesidad de drenaje puede realizarse utilizando luz monocromática o energía radiante de varias frecuencias para medir la opacidad de la mezcla. Así, con un medio transparente o translúcido, tal como leche, una fuente de luz puede ser colocada en un lado de la columna y una célula fotoeléctrica en el otro lado (conectada a un amplificador y un registrador) para medir la opacidad de la mezcla y determinar de este modo la posición de las capas de espermias separadas.

La posición de las capas separadas puede también ser determinada midiendo la conductividad en varios puntos de la columna. Para ello se colocan múltiples electrodos en la columna para determinar el cambio de conductividad del contenido de la columna en varios puntos de su longitud. La conductividad de las capas de espermias separadas es diferente de la del medio portador de



las mismas.

Otros medios para la determinación de la posición de las capas de espermas sedimentadas comprenden un microdensímetro, que mide la densidad utilizando luz polarizada, y técnicas microscópicas que miden la dispersión de la luz polarizada.

Según otra forma de realización, un tubo de gelatina puede reemplazar a la probeta. Cuando se produce la separación entre las espermas X y las espermas Y, el tubo y su contenido son refrigerados escalonadamente a temperaturas muy por debajo del punto de congelación, por ejemplo -20°C , y la mezcla separada es congelada in situ. El tubo congelado puede entonces ser cortado en fracciones apropiadas según se desee. Con ello resulta posible el almacenaje de las espermas separadas durante periodos relativamente largos.

Como ejemplo generalizado, que ilustre el funcionamiento del aparato, puede prepararse un medio con cuatro partes de yema de huevo y una parte de glicina al 4% en agua. Semen recién recogido es mezclado con este medio de modo que se obtiene una población de 2 a 3 centenares de millones de espermas por milímetro, dejando reposar a temperatura de ambiente durante 15 minutos. La temperatura de la mezcla es bajada a 0°C . Esta mezcla es introducida en la parte superior de una columna del medio en una probeta. El medio en la columna se encuentra también a 0°C . Se dejan luego sedimentar las espermas durante 12 horas, después de lo cual se extraen fracciones.

325199

26



En cada fracción se cuenta separadamente la cantidad de espermias contenidas en la misma y esta cantidad es registrada en un diagrama en relación con las demás fracciones.

5

Ejemplo 1

Semen humano fresco fue mezclado con un medio de 4 partes de yema de huevo y 1 parte de glicina al 4%. La densidad del medio era de 1.0273, la viscosidad de 0.4326 poise, y el pH de 6.09, todos ellos medidos a 20°C. La mezcla fue absorbida por el semen durante un período de 15 minutos e introducida en un refrigerador a 3°C. Después de 8 horas, la temperatura de la mezcla fue disminuida a 0°C. Doce horas más tarde fue introducida la mezcla en una columna del mismo medio descrito más arriba, mantenido a 0°C. La columna entera fue introducida en un refrigerador a 0°C durante 18 horas. A continuación fueron extraídos por drenaje fracciones de 15 gotas, requiriendo cada fracción 45 segundos para el drenaje, con un período de espera de 45 segundos entre cada período de drenaje. Una muestra de cada fracción fue recogida en una pipeta y diluida 200 veces con una solución salina formal al 5%. Las espermias fueron contadas en un hemacitómetro bajo un microscopio. Cuando se determinaron fracciones de espermias críticas para la representación gráfica, fue examinada una segunda muestra de la misma fracción y tomado el promedio de los dos resultados. Las cantidades de espermias determinadas están representadas gráficamente en la Fig. 3. En esta figura

10

15

20

25

325199



puede observarse que se obtuvieron dos picos o valores máximos en las fracciones 1 y 19.

Ejemplo 2

Semen humano fresco fue mezclado con un medio de 4
5 partes de yema de huevo y 1 parte de glicina en agua al
4%. La densidad del medio era de 1.0239 y el pH de 6.10,
ambos medidos a 20°C. La mezcla fue absorbida por el se-
men durante un período de 15 minutos e introducida en
un refrigerador a 3°C. Después de 10 horas, la tempera-
10 tura fue reducida a 0°C. Trece horas más tarde fue intro-
ducida la mezcla en una columna del mismo medio descrito
más arriba y mantenido a 0°C. La columna entera fue in-
troducida en un refrigerador a 0°C. Después de sedimen-
tación durante 9-1/2 horas, fueron extraídas por drenaje
15 fracciones de 15 gotas, requiriendo cada fracción 45 se-
gundos para el drenaje, con un período de espera de 45
segundos entre cada período de drenaje. Una muestra de
cada fracción fue tomada mediante una pipeta y diluida
200 veces con una solución salina formal al 5%. Las es-
20 permas fueron contadas en un hemacitómetro bajo un mi-
croscopio. Cada cantidad crítica de espermias fue medida
por segunda vez y tomado luego el promedio. Las cantida-
des de espermias determinadas están representadas gráfi-
camente en la Fig. 8. En esta figura puede observarse
25 que se obtuvieron dos picos o valores máximos en las
fracciones 15 y 20.

325 199



Ejemplo 3

Semen fresco de toro de Hereford fue mezclado con un medio de 4 partes de yema de huevo y 1 parte de glicina al 4%. La densidad a 20°C era de 1.0263. La mezcla
5 fue absorbida por el semen durante un período de 15 minutos e introducida en un refrigerador a 0°C durante 7-1/2 horas. A continuación fue introducida la mezcla en una columna del mismo medio descrito más arriba y mantenido a 0°C. La columna entera fue introducida en
10 un refrigerador a -0.5°C durante 11-1/2 horas. El drenaje y el proceso de contado de las espermias se llevó a cabo del mismo modo descrito en los Ejemplos 1 y 2. Las cantidades de espermias determinadas están representadas gráficamente en la Fig. 9. En esta figura puede observarse que se obtuvieron dos picos o valores máximos en
15 las fracciones 1 y 20.

Ejemplo 4

Semen fresco de toro de Jersey fue mezclado con el mismo medio utilizado en los ejemplos precedentes. La
20 densidad era de 1.0283, la viscosidad de 0.430, el pH de 6.1, todas las mediciones hechas a 20°C. La mezcla fue absorbida por el semen durante un período de 15 minutos e introducida en un refrigerador durante 5 horas a una temperatura de 0°C. A continuación, la mezcla fue intro-
25 ducida en una columna del mismo medio arriba descrito y mantenido a 0°C. La columna entera fue introducida en un refrigerador a 0°C durante 12-1/2 horas. Después de sedimentación, se siguieron los mismos procesos de dre-

325 199



naje y medición descritos en los ejemplos precedentes. Las cantidades de espermias determinadas están representadas gráficamente en la Fig. 10. En esta figura puede observarse que se obtuvieron dos picos o valores máximos en las fracciones 1 y 18.

Los ejemplos precedentes relativos a toros son ilustrativos de la técnica de separación determinada para la obtención de más de un 60% de descendencia de un sexo mediante inseminación artificial, utilizando técnicas convencionales.

Aunque la sedimentación se ha descrito como una forma de realización específica de la invención, es evidente que la separación de las espermias Y, más pequeñas y de menor densidad que las espermias X, puede ser llevada a cabo por cualquier medio apropiado. Así, aplicando una fuerza mayor (o de diferente dirección) que la gravedad, puede producirse bajo condiciones apropiadas una separación de acuerdo con el tamaño y la forma de las partículas. Una centrifuga, por ejemplo, puede ser empleada para aplicar una fuerza mayor que la gravedad. Además, en ciertos medios, las espermias X y las espermias Y presentan diferentes velocidades de ascensión, en contraste con las velocidades de sedimentación, y pueden ser separadas de este modo. De hecho, eligiendo un medio de densidad menor que la densidad media de las espermias X y mayor que la densidad media de las espermias Y, estas últimas pueden ser inducidas a ascender y las espermias X a descender. Mediante una absorción selectiva

325 199

26



de sustancias apropiadas, puede aumentarse la ascensión positiva del mismo modo que la absorción selectiva de glicina, por ejemplo, aumenta la ascensión negativa.

El aparato permite la sedimentación de mezclas de
5 espermas de modo que las espermas X de mayor densidad
descienden a mayor velocidad que las espermas Y de menor densidad, y por tanto pueden ser separadas. El método permite una separación substancialmente completa de
los tipos de espermas en dos composiciones nuevas. La
10 selección de la composición apropiada permite el control
del sexo de la descendencia producida por la misma.

N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de ponerlo en práctica, se hace
15 constar que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio fundamental, puede quedar sometido a variaciones de detalle. También se hace constar que esta invención corresponde a la descrita en la Solicitud de Patente Ser. Nº 443.473, depositada en los Estados Unidos de
20 América en 29 de Marzo de 1965, cuya prioridad se reivindica de acuerdo con los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo esencial y por lo que se solicita Patente de Invención, por veinte años, lo que queda resumido en las siguientes reivindicaciones:

25 1ª.- Un método para controlar el sexo en la descendencia de mamíferos, particularmente para separar esperma X de esperma Y de acuerdo con diferencias fenotípicas, caracterizado por las operaciones de mezclar esperma

325199

26 MAR 1966



fresca con un medio nutritivo viscoso permeable a la esperma, y de separar la mezcla en dos fracciones, una fracción que contenga toda la esperma X, y una fracción que contenga toda la esperma Y.

5 2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque dicha esperma es esperma humana.

10 3ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque dicha esperma es esperma de un miembro del grupo de mamíferos que incluye cuadrúmanos, ganado, cerdos, ovejas, conejos, gatos, búfalos, cabras y caballos.

15 4ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque dicho medio nutritivo viscoso, permeable a la esperma, contiene al menos un producto del grupo que comprende yema de huevo, dextran, leche entera de mamífero, leche seca de mamífero, crema de coco, jugo de tomate, glicerol, glucosa, fructosa, lecitina, aminoácido, flúidos de cuerpos vivos, y extractos de tejidos.

20 5ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque el medio es una mezcla de monosacáridos y aminoácido.

25 6ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque el medio es una mezcla de yema de huevo y glicina.

 7ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque dicho medio es una mezcla de dextran, lecitina y aminoácidos.

325 199

26



8ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque dicho medio es un fluido corporal.

5 9ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque dicho medio tiene un pH entre 6.0 y 6.8 a 20°C y una presión osmótica entre 270 y 330 milímetros de mercurio.

10 10ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque la separación se efectúa colocando la mezcla de esperma y medio en una columna llenada de medio, permitiendo que la esperma X y la esperma Y descendan en la columna a un punto en el que la más densa esperma X quede substancialmente separada de la menos densa esperma Y, y extrayendo las fracciones separadas de la columna.

15 11ª.- Un método según la reivindicación 10ª, caracterizado además porque la esperma X es completamente separada de la esperma Y.

20 12ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque las fracciones separadas son congeladas dentro de la columna, y la columna congelada es cortada en fracciones que contienen esperma del sexo deseado.

25 13ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque después de la citada operación de mezclar esperma humana fresca con el medio nutritivo, se permite que el medio quede absorbido por la esperma, después de lo cual se enfría la mezcla a una temperatu-

325199

2



ra por debajo de 1°C.

5 14ª.- Un método según la reivindicación 13ª, caracterizado además porque en dicha operación de separación se separa al menos un 60% de la esperma que contiene cromosomas de un sexo, de la esperma restante.

15ª.- Un método según la reivindicación 14ª, caracterizado además por separarse al menos un 75% de la esperma de un sexo.

10 16ª.- Un método según la reivindicación 14ª, caracterizado además por separarse al menos un 90% de la esperma de un sexo.

15 17ª.- Un método según la reivindicación 13ª, caracterizado además porque dicho medio tiene una densidad entre 1.02 y 1.09 gramos por centímetro cúbico y una viscosidad entre 0.02 y 1.2 unidades cegesimales de viscosidad, medidas a 20°C.

20 18ª.- Un método según la reivindicación 13ª, caracterizado además porque dicho medio tiene una densidad mayor de 1.026 gramos por centímetro cúbico y una viscosidad menor de 1.0 unidad cegesimal de viscosidad, medidas a 20°C.

25 19ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque la esperma separada que contiene los cromosomas deseados es inseminada artificialmente en una hembra, para dar lugar a la concepción y producir descendencia del sexo deseado.

20ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque la mezcla de medio y esperma es

325199

26



enfriada y la separación se efectúa por aplicación de una fuerza ascensional a la esperma de modo que la esperma más densa alcance un nivel diferente en el medio que la esperma menos densa y substancialmente toda la
5 esperma X quede separada de la esperma Y dentro del medio, separando las fracciones que contienen esperma más densa de las fracciones que contienen esperma menos densa, e inseminando artificialmente una hembra con la esperma que contiene los cromosomas del sexo deseado,
10 para dar lugar a la concepción y producir descendencia del sexo deseado.

21ª.- Un método según la reivindicación 20ª, caracterizado además porque la fuerza ascensional es aplicada de modo que la esperma pueda sedimentar por gravedad.

15 22ª.- Un método según la reivindicación 1ª, caracterizado además porque el medio nutritivo tiene una viscosidad por debajo de 1.0 unidad cegesimal de viscosidad, una densidad por encima de aproximadamente 1.026 gramos por centímetro cúbico, un pH entre 6.0 y 6.8,
20 siendo medidos dichos viscosidad, densidad y pH a 20°C, bajando gradualmente la temperatura de dicha mezcla a una temperatura entre aproximadamente -5°C y aproximadamente +1.0°C, manteniendo suspendida la esperma Y en una fracción superior del medio y permitiendo que la
25 esperma X descienda a una fracción inferior de dicho medio durante un período de aproximadamente 1 a 24 horas antes de proceder a la separación de las fracciones de dicho medio que contienen esperma X de las fracciones

325199

26



que contienen esperma Y.

23^a.- Un método según la reivindicación 22^a, caracterizado además porque la presión osmótica del medio nutritivo es entre 270 y 330 milímetros de mercurio, la fase de descenso de la temperatura se efectúa durante un período entre 1 y 300 minutos, la separación se realiza en una columna llenada de medio mantenido por debajo de 1.0°C, y la esperma X y la esperma Y se dejan sedimentar a través del medio en la columna durante un período de aproximadamente 1 a 24 horas, después de lo cual las fracciones separadas son extraídas de la columna.

24^a.- Un método según la reivindicación 23^a, caracterizado porque el medio nutritivo es absorbido por dicha esperma en proporción a la cantidad de cromosomas presentes en dicha esperma.

25 25^a.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se produce una composición que consiste esencialmente en esperma que tiene cromosomas X en un medio nutritivo.

26^a.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 24^a, caracterizado porque se produce una composición que consiste esencialmente en esperma que tiene cromosomas Y en un medio nutritivo.

25 27^a.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 24^a, caracterizado porque se produce una composición que comprende esperma X humana artificialmente densificada en un medio nutritivo.

325199.26



28ª.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 24ª, caracterizado porque se produce una composición que comprende esperma Y humana artificialmente densificada en un medio nutritivo.

5 29ª.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 24ª, caracterizado porque se produce una composición que comprende esperma humana en un medio nutritivo, teniendo al menos el 60% de dicha esperma cromosomas X.

10 30ª.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 24ª, caracterizado porque se produce una composición que comprende esperma X y esperma Y en un medio nutritivo, estando separado al menos el 75% de dicha esperma X de la esperma Y en dicho medio.

15 31ª.- Un método según la reivindicación 30ª, caracterizado porque dicha esperma es esperma de un cuadrúmano.

20 32ª.- Un método según la reivindicación 30ª, caracterizado porque dicha esperma es esperma de un miembro del grupo que incluye ganado, cerdos, ovejas, conejos, cabras, gatos, búfalos y caballos.

33ª.- Un método según la reivindicación 30ª, caracterizado porque al menos el 90% de dicha esperma tiene cromosomas de un sexo.

25 34ª.- Un método según la reivindicación 30ª, caracterizado porque dicho medio tiene una viscosidad por debajo de aproximadamente 1.0 unidad cegesimal de viscosidad, una densidad por encima de aproximadamente 1.026

325199

26



gramos por centímetro cúbico, dicha viscosidad y dicha densidad medidas a 20°C, un pH entre aproximadamente 6.0 y 6.8 y una temperatura por debajo de aproximadamente 1.0°C.

5 35ª.- Aparato para la realización del método según las reivindicaciones 1ª a 34ª, apropiado para separar tipos X e Y de esperma, comprendiendo un recipiente para la mezcla de esperma, medios de enfriamiento asociados a dicho recipiente, medios para introducir una mezcla
10 de esperma en dicho recipiente, caracterizado porque dicho recipiente consiste en un cilindro de diámetro gradualmente decreciente en su extremidad inferior, un dispositivo de válvula dispuesto por debajo de dicho recipiente y provisto de una abertura de diámetro gra-
15 dualmente decreciente para gradualmente extraer porciones de dicha mezcla de esperma, siendo el diámetro mínimo de dicho recipiente substancialmente el mismo que el diámetro máximo de la abertura del dispositivo de
20 válvula, medios protectores que envuelven a dicho dispositivo de válvula y separados de él para impedir contaminación de la mezcla que es extraída de dicho recipiente.

25 36ª.- UN METODO PARA CONTROLAR EL SEXO EN LA DESCENDENCIA DE MAMIFEROS, Y APARATO PARA LA REALIZACION DE ESTE METODO,
tal y como queda descrito y reivindicado en la presente memoria que consta de treinta y cinco hojas mecano-

325 199

26



grafiadas por una sola cara y de dos láminas de dibujos.

BARCELONA, 26 de Marzo de 1966.

SWB RESEARCH CORPORATION
P.P.

J. GOMEZ-ACEBO Y MODET
p. p. firmado: W. Stöckli Stäner

325 199

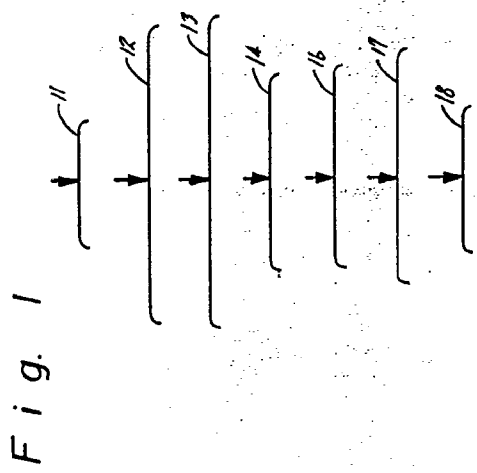


Fig. 1

DISTANCIA (en centímetros)

0 cm

325 199

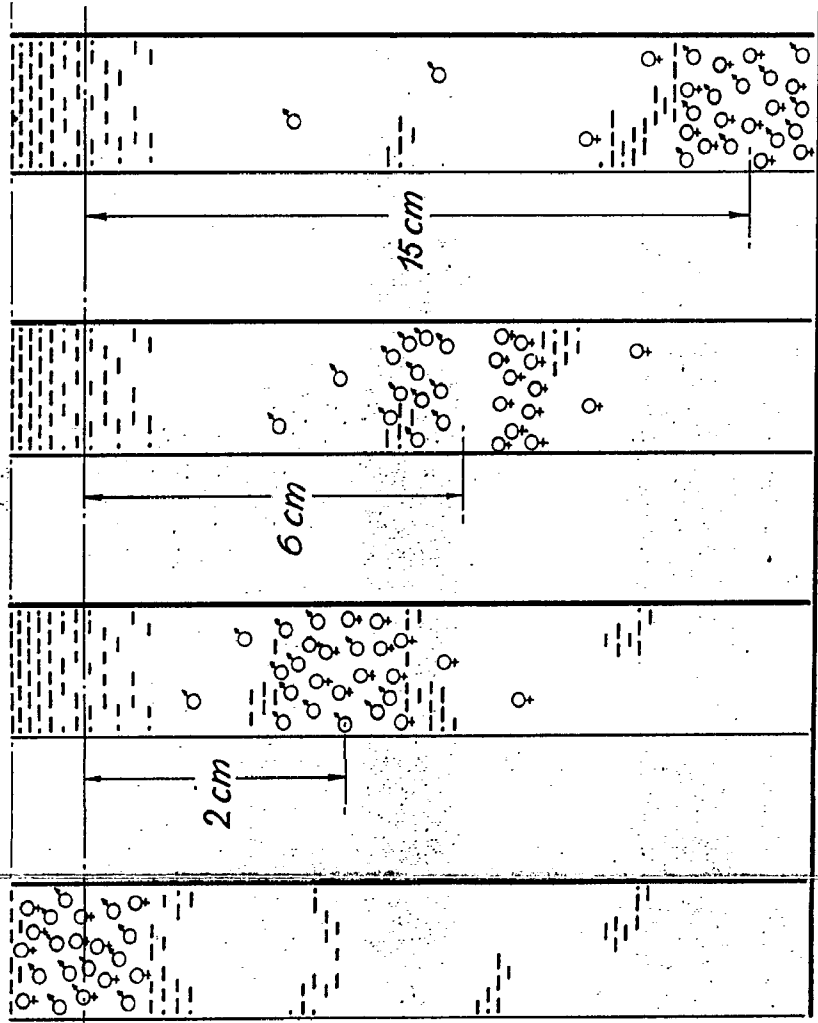


Fig. 2

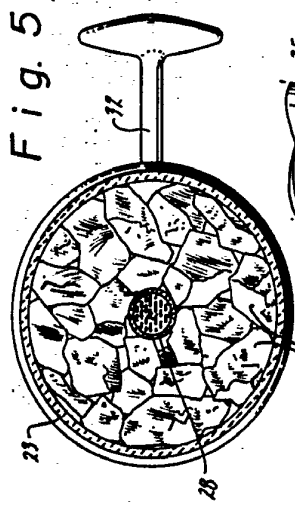


Fig. 5

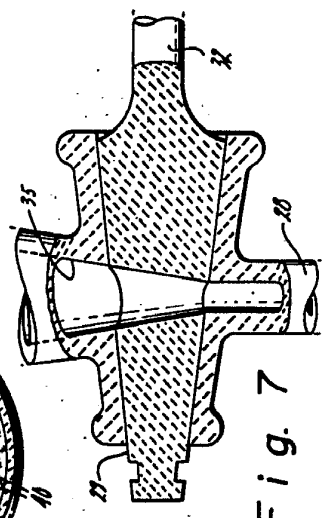


Fig. 7

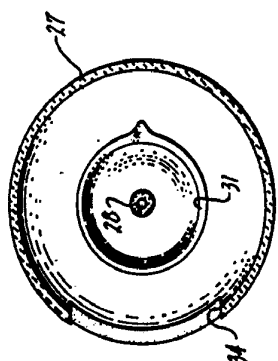
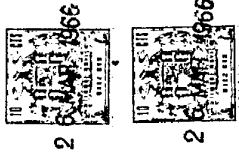


Fig. 6



POOR QUALITY

325199

Fig. 1

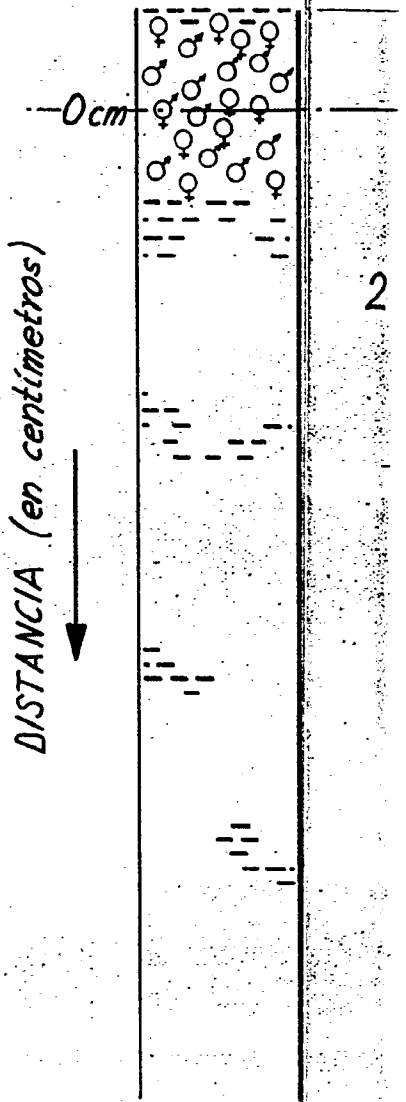
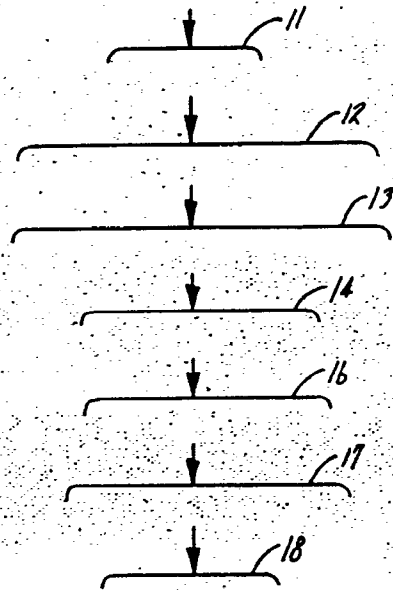


Fig. 5

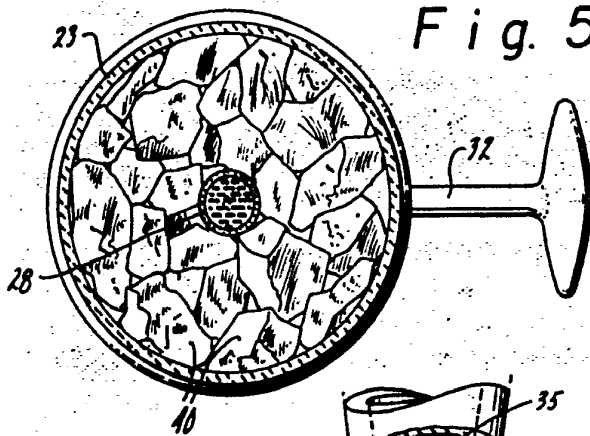
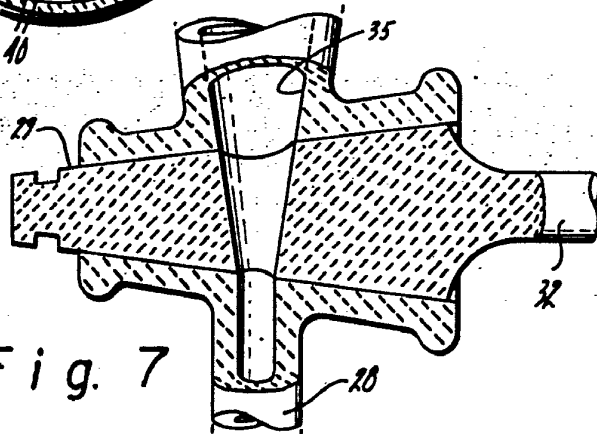


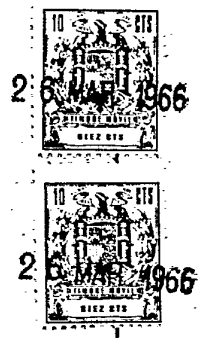
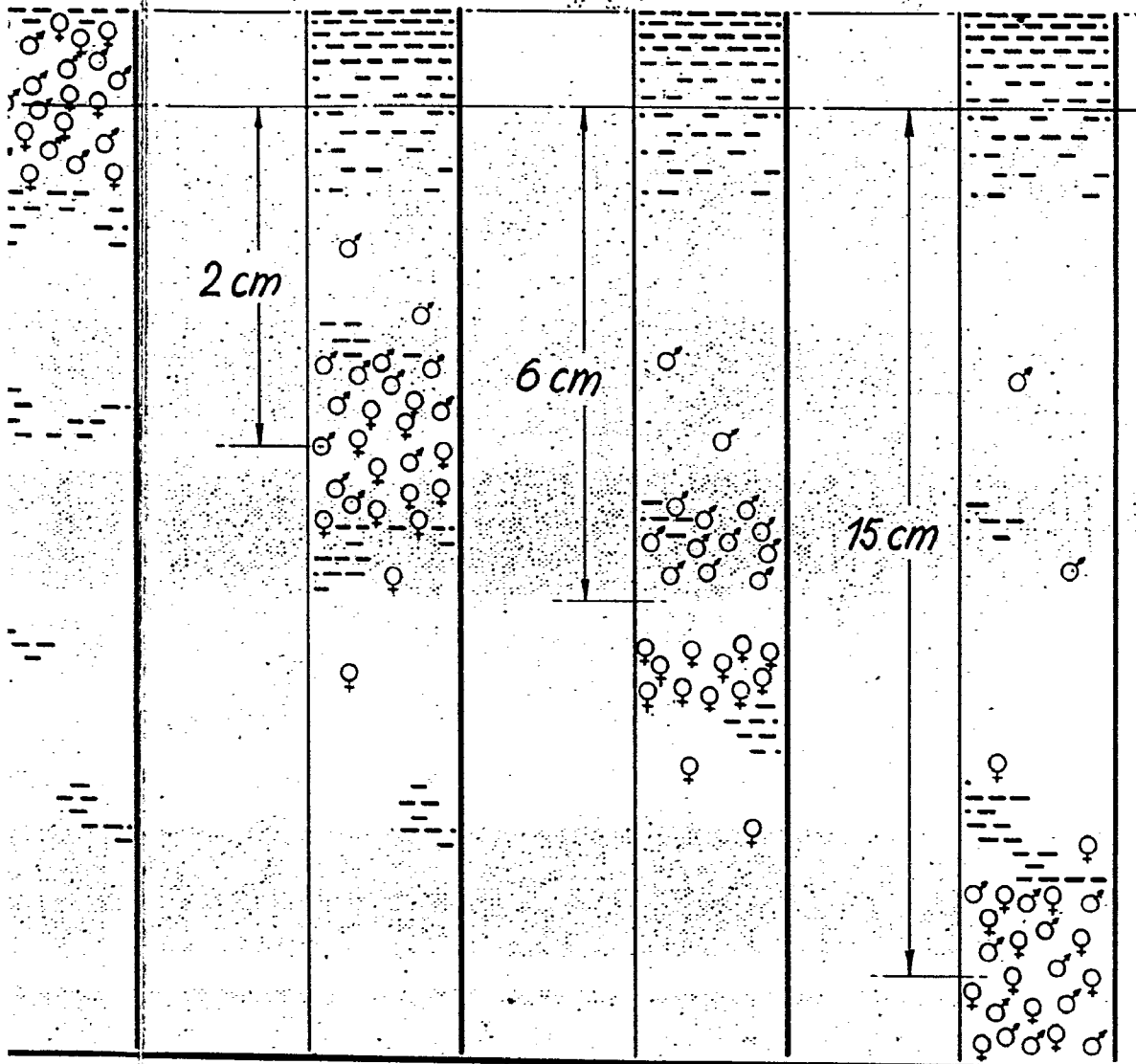
Fig. 7



Fig

POOR
QUALITY

325 199 ESCALA VARIABLE



0 4 12 30

Fig. 2 TIEMPO (en horas)

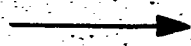
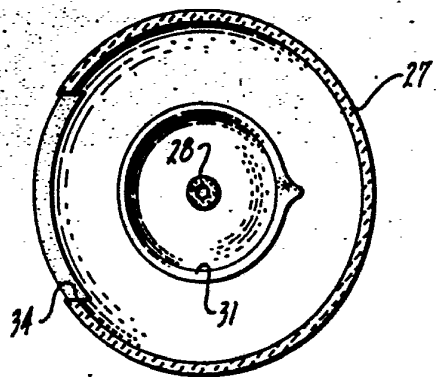


Fig. 6



BARCELONA, 26 de Marzo de 1966

SWB RESEARCH CORPORATION

P.P. 1 SQUEZ ACERO Y MODEX

325199

325199

ESCALA VARIABLE.

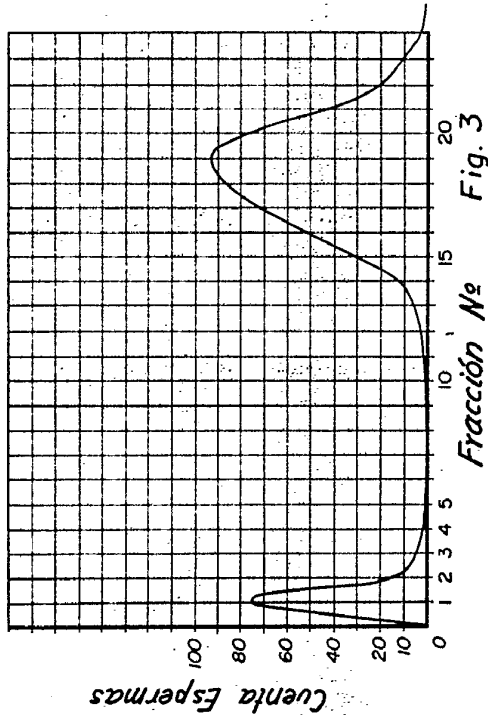
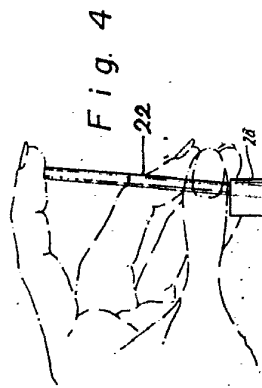
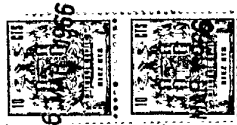


Fig. 3

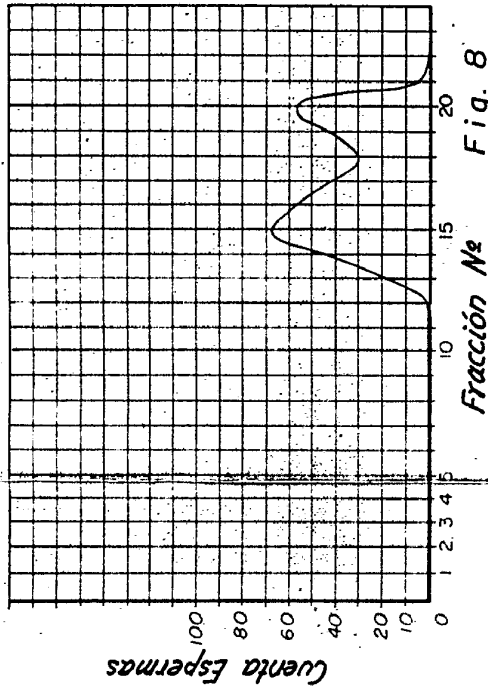


Fig. 8

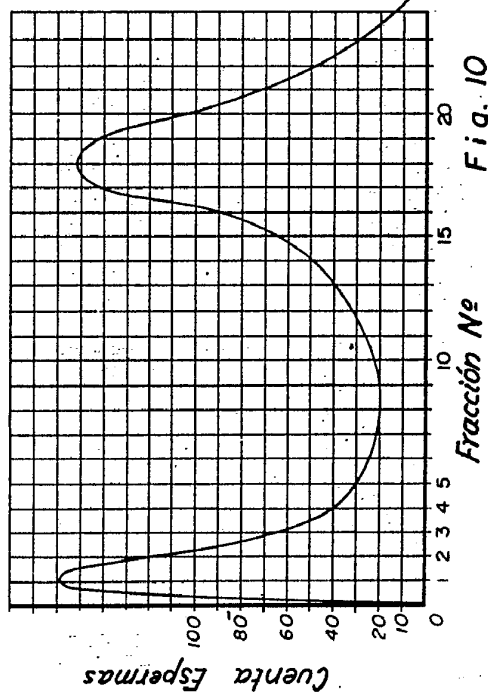


Fig. 10

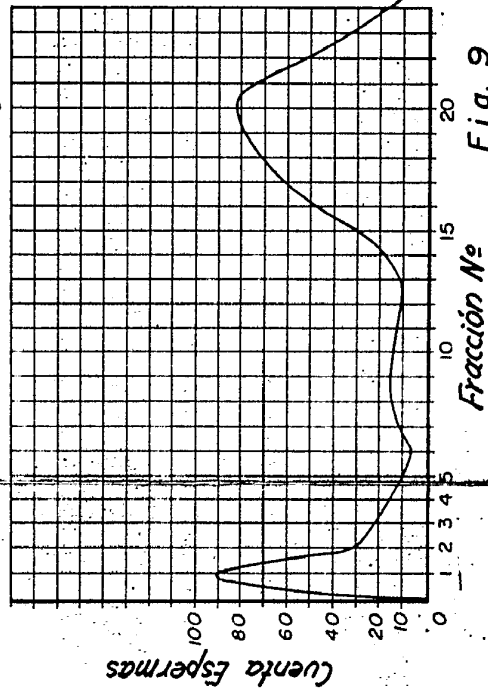
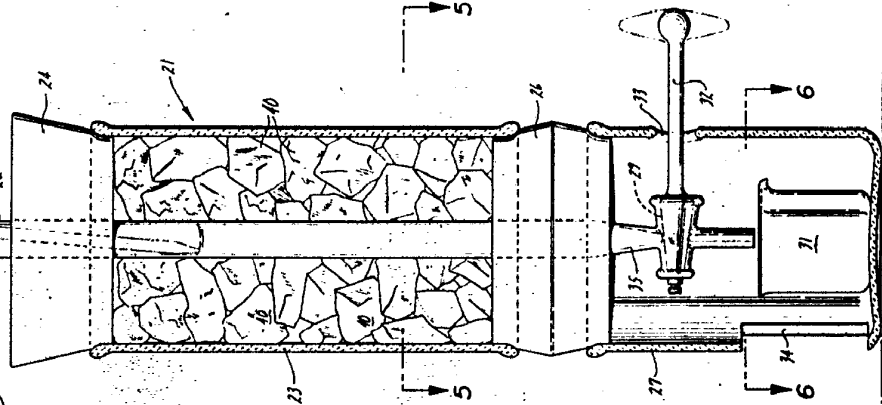


Fig. 9

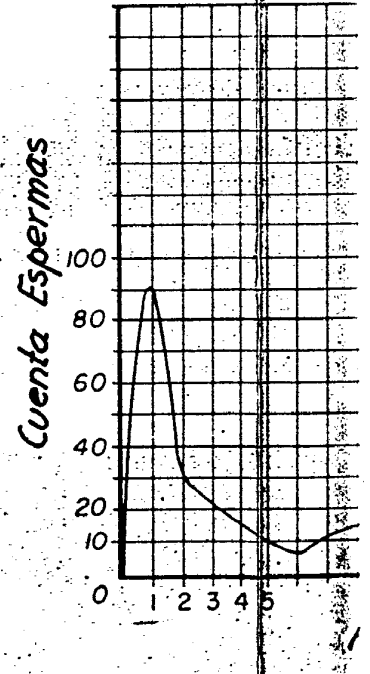
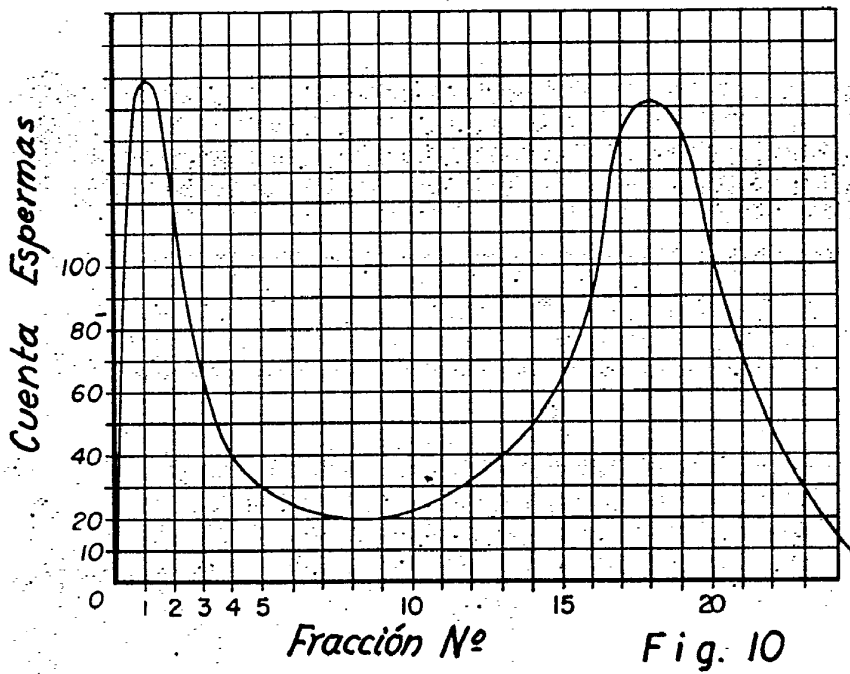
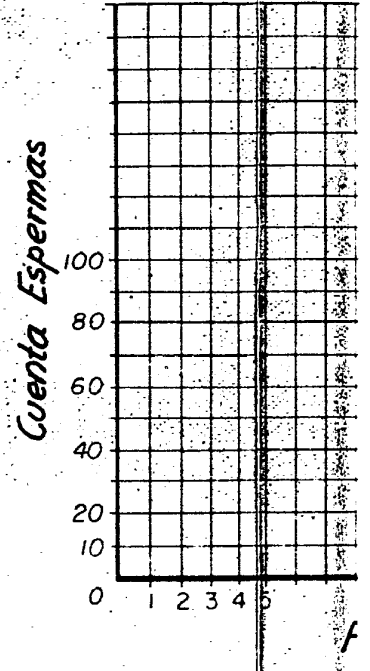
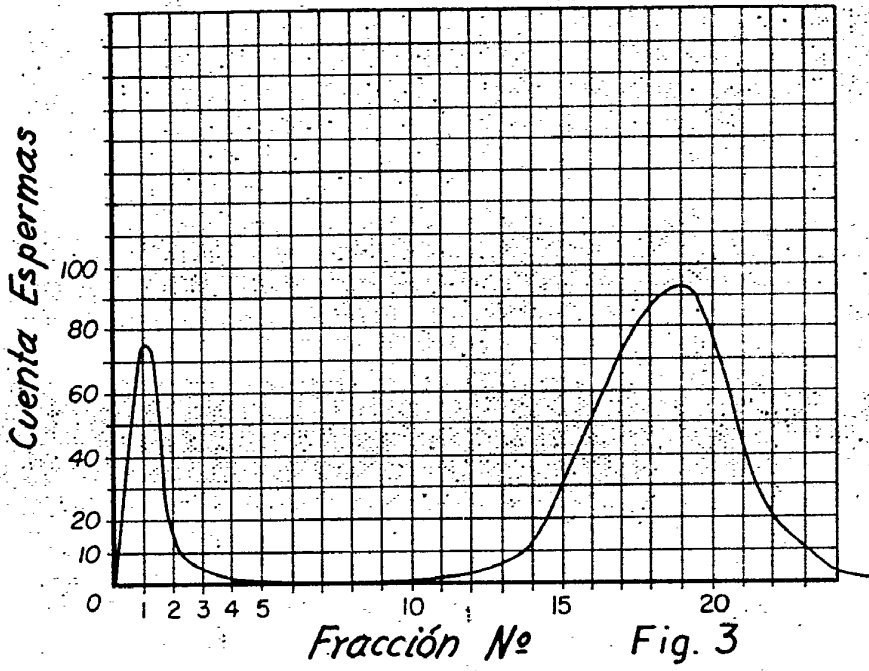


POOR QUALITY

BARCELONA, 26 de Marzo de 1966
SWB RESEARCH CORPORATION

J. GOMEZ-ACEBO Y MOJED

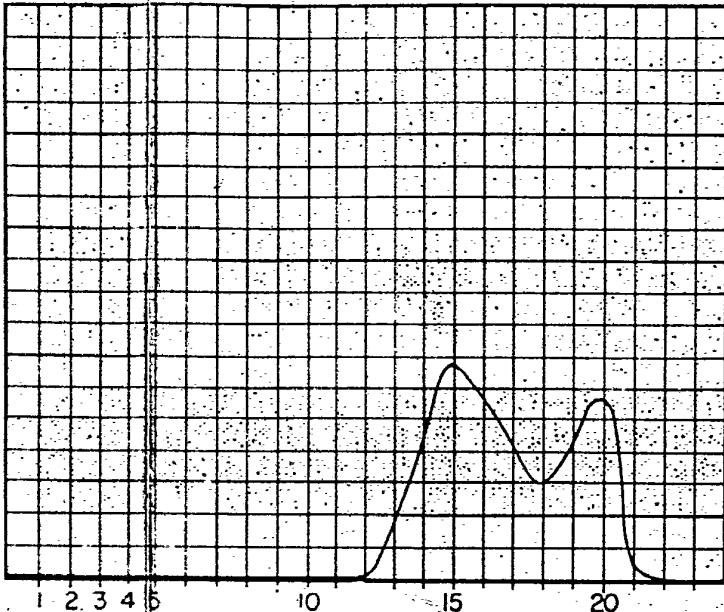
325199



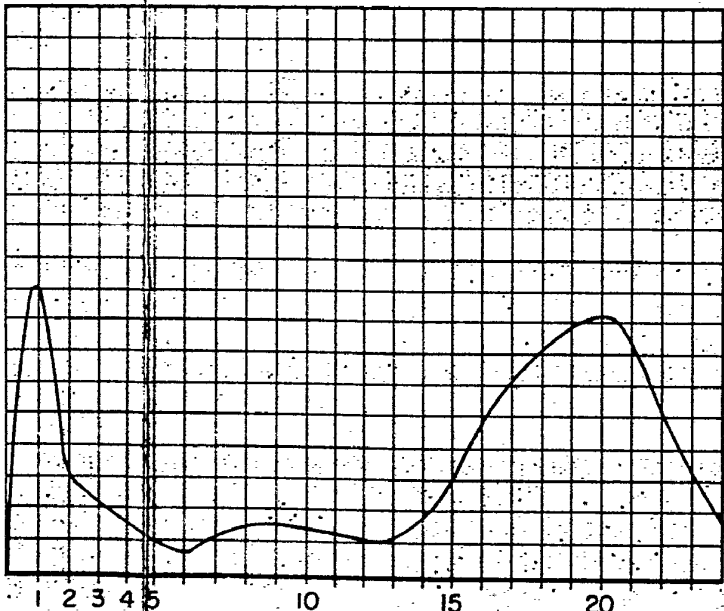
POOR QUALITY

ESCALA VARIABLE.

325199



Fracción No. 8 Fig. 8



Fracción No. 9 Fig. 9

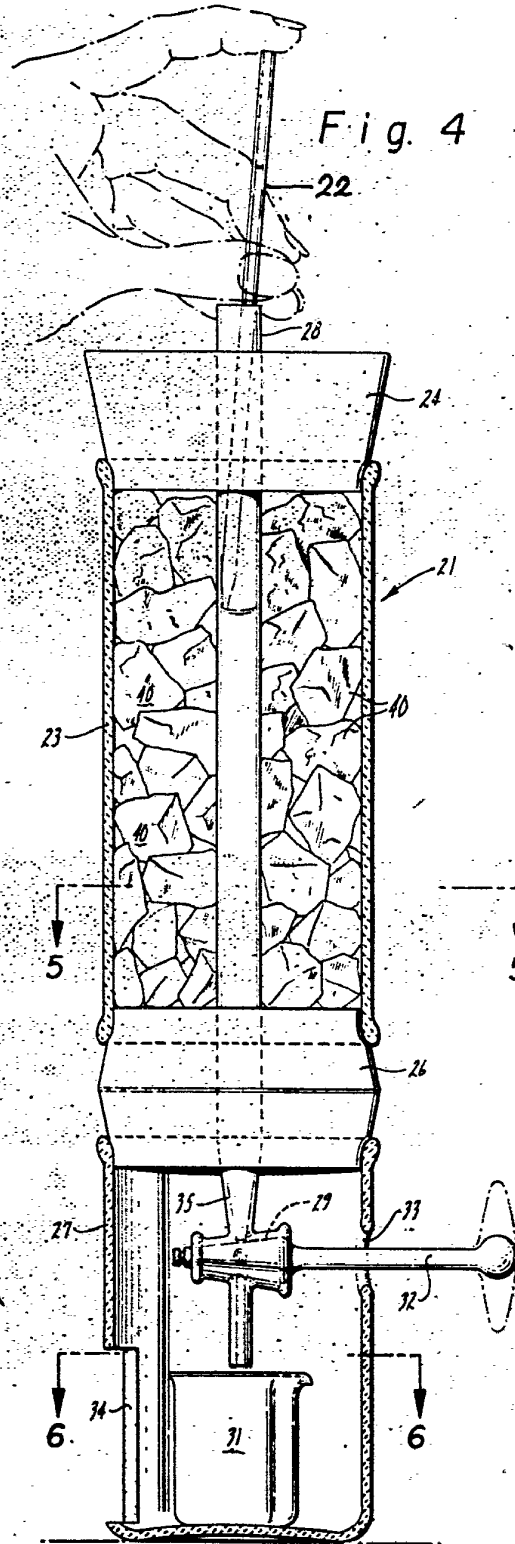
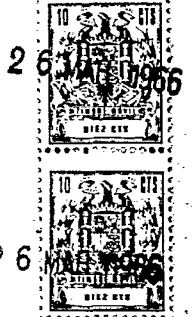


Fig. 4



BARCELONA, 26 de Marzo de 1966
SWB RESEARCH CORPORATION

J. GOMEZ-ACEBO Y MODET
p. g. Firmado: W. Stäheli Stgner