



1972

SECCION TECNICA  
CLASIFICACION I. P. C.  
CLASE C 12  
SUBCLASE K

Nº 378.413 **378413**

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

### PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: WALLACE SHRIMPTON

RESIDENCIA: 350 Arballo Drive, San Francisco,

California, USA.

ENUNCIADO: METODO Y APARATO PARA REGULAR EL SEXO

DE LA DESCENDENCIA EN LOS MAMIFEROS

MEDIANTE FRACCIONAMIENTO DEL ESPERMA.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 814,906 del 10.4.69.

MGS. ✓

378413



1 Este invento se refiere a un método de fraccionamiento  
del esperma; a un aparato para uso en el método, a una  
composición espermática y a un método para controlar el se-  
5 xo de la descendencia de los mamíferos empleando la compo-  
sición.

Se ha determinado que el sexo de la descendencia es  
controlado por los cromosomas del espermatozoide particular  
o célula del esperma que fertiliza al huevo. Más específica-  
mente, se sabe que algunos de los espermatozoides (denomina-  
10 dos en adelante "esperma") contienen genotípicamente cromoso-  
mas X, que son portadores de genes productores de hembras,  
mientras que los otros contienen cromosomas Y que son de  
tamaño menor que los cromosomas X y que son portadores de ge-  
nes productores de machos. Cuando un esperma que contiene  
15 cromosomas X (denominado en adelante "esperma X") o un esper-  
ma que contiene los cromosomas Y (denominado en adelante  
"esperma Y") se combina con el huevo, que contiene cromosomas  
X, resultan respectivamente descendientes machos o hembras.  
La población de espermatozoides en un eyaculado de un mamífero ma-  
20 cho contiene espermatozoides X y espermatozoides Y. Hasta ahora, no se  
ha conseguido satisfactoriamente la separación del esperma  
X e Y. Sin embargo, es evidente que un procedimiento satis-  
factorio para aislar fracciones prácticamente puras de esper-  
ma X y esperma Y permitiría la elección o selección del se-  
25 xo final de la descendencia.

Se ha encontrado que los espermatozoides X e Y de los mamífe-  
ros pueden ser separados de acuerdo con las características  
de densidad, mediante la aplicación de fuerzas de flotación  
dentro de un medio líquido de separación para hacer que el  
esperma más flotante alcance un nivel diferente en el medio  
30



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

de separación al del esperma menos flotante. El término "fuerza de flotación" en el sentido utilizado aquí incluye las fuerzas de flotación positivas que hacen que el esperma ascienda o flote en el medio y las fuerzas de flotación negativas que hacen que el esperma descienda o se sedimente en el medio. Preferiblemente se hace uso de un medio ( o medios) de separación dispuestos en forma de columna prácticamente vertical y con un gradiente de densidad uniforme desde la densidad más baja en la parte superior a la densidad más alta en el fondo. Alternativamente, el medio de separación puede encontrarse en forma de capas o zonas de líquidos compatibles, cada una de ellas de densidad ligeramente diferente, para proporcionar análogamente unos medios de separación que varían desde la densidad más baja en la parte superior a la densidad más alta en el fondo de una columna. La separación se consigue introduciendo una población de espermias en el medio de separación en un punto intermedio entre los extremos de la columna, en medios equivalentes en densidad a la del punto de introducción, de forma que el esperma se separa de acuerdo con su densidad mediante la aplicación simultánea de flotabilidad positiva y negativa.

Es posible predecir el ascenso o descenso de una partícula inerte en un medio líquido mediante la ley de Stokes, que relaciona la velocidad de una partícula inerte con las fuerzas de flotación dentro del líquido, la viscosidad del líquido, la fuerza gravitatoria y la diferencia de densidad entre el medio y la partícula. Se deduce de la ley de Stokes, la siguiente ecuación:

$$v = \frac{K(d_1 - d_2)g}{w}$$

30



378413

- 1 donde  $v$  = velocidad de la partícula (cm.  $\text{seg}^{-1}$ )
- $k$  = constante numérica de la ley de Stokes multiplicado por los factores de la partículas relativos a la eficiencia hidrodinámica en el medio
- 5  $d_1$  = densidad de la partícula
- $d_2$  = densidad de los medios
- $g$  = aceleración de la gravedad ( $981 \text{ seg}^{-2}$ )
- $w$  = viscosidad a la temperatura del medio, en centipoises

Según la ley de Stokes, la velocidad de ascenso o descenso de la partícula varía con la eficiencia hidrodinámica que está relacionada con el tamaño y forma de la partícula, con la diferencia de densidad entre el medio y la partícula y con las características del medio como solución newtoniana a la temperatura de separación. Cuando la velocidad de ascenso o descenso en una clase de partículas está estrechamente relacionada con la ley de Stokes, las partículas en un líquido de densidad uniforme tienden a ascender o descender de conformidad con los factores antes señalados. Cuando el líquido de separación varía de densidad o presenta un gradiente de densidades, se puede esperar que la velocidad de ascenso o descenso se reduzca a cero en el punto en el que la densidad de la partícula es igual a la densidad del líquido.

Hemos encontrado que, bajo condiciones cuidadosamente controladas, una población de espermias introducida en una columna de separación en un punto intermedio puede ser separada, por lo menos en parte, gracias al ascenso y descenso del espermia que depende de las densidades del espermia individual. Además, cuando los medios de separación tienen un gradiente de densidad uniforme, el espermia alcanzará un estado suspendido de separación que depende de las ligeras variaciones de



1 densidad en el esperma individual de forma que se pueden se-  
parar fácilmente del conjunto las fracciones o capas de es-  
perma deseadas. Cuando la gama de densidades del líquido den-  
tro del gradiente de densidad abarca completamente la gama  
5 de densidades del esperma individual, las fracciones o pobla-  
ciones de esperma en la parte superior e inferior de la colum-  
na producirán, cuando son inseminadas, una descendencia de  
diferente sexo. Finalmente, las diferencias fenotípicas ob-  
servadas en el esperma obtenido de estas fracciones superior  
10 e inferior (hasta el 10 % de la población de esperma total)  
han resultado estar relacionadas con los genotipos de sexo,  
es decir, se ha encontrado que la fracción superior contie-  
ne prácticamente la totalidad del esperma Y mientras que la  
fracción inferior contiene prácticamente la totalidad del  
15 esperma X.

Como se ha indicado anteriormente, existe una dife-  
rencia entre la densidad media del esperma X y del esperma  
Y de las especies de mamíferos, siendo en general más denso  
el esperma X que el esperma Y. Por ejemplo, en los toros,  
20 esta diferencia de densidad media entre el esperma que con-  
tiene los cromosomas X y el que contiene los Y se cree que  
es del orden de 0,5 % a 0°C. En el hombre y en los conejos,  
la diferencia parece ser mayor que en los toros.

El invento proporciona un método para fraccionar el  
25 esperma, cuyo método consiste en enfriar una mezcla del es-  
perma y un medio nutritivo para inmovilizar prácticamente  
al esperma; introducir la mezcla en un medio de separación  
que comprende un medio nutritivo, teniendo por lo menos par-  
te del medio de separación una densidad prácticamente igual  
30 a la densidad de la mezcla e introduciendo la mezcla en di-



378413

1 cha parte del medio de separación, permitiendo que tenga  
lugar la separación del esperma a diferentes niveles en el  
medio de separación.

5 El invento también proporciona un aparato para frac-  
cionar el esperma, que comprende una columna esencialmente  
vertical rodeada por un dispositivo refrigerante y provista  
de una entrada controlada a válvula para el esperma y el me-  
dio nutritivo adyacente a la parte central de su altura y una  
conexión controlada a válvula en su parte inferior y disposi-  
10 tivos para alimentar proporcionalmente los medios de sepa-  
ración desde los depósitos respectivos para llenar la colum-  
na con un medio de separación mezclado de densidad variable  
y dispositivos para retirar las fracciones de las posiciones  
superior e inferior de la columna.

15 El invento es útil siempre que se desee controlar el  
sexo de la descendencia de los mamíferos, especialmente en  
el campo de la cría de animales, por ejemplo permitiendo que  
el ganadero o granjero pueda elegir en la selección del se-  
xo de la descendencia animal. A título de ilustración, el  
20 granjero lechero puede elegir para obtener solamente descen-  
dencia femenina de animales superiores de su ganado mientras  
que obtiene terneros del resto del ganado, aumentando de es-  
ta forma su beneficio comercial en la venta de terneros y  
la calidad genética de su ganado al mismo tiempo que aumenta  
25 la producción de leche procedente de vacas mejoradas.

En lo que se refiere a la procreación humana, es sabi-  
do que el rápido aumento en la población humana plantea una  
seria amenaza de superpoblación eventual. Un fuerte incenti-  
vo de la procreación humana es el deseo de tener descendencia  
30 de un sexo particular que, cuando es frustrado, conduce a otra



378413

1 procreación. El invento permite a los padres seleccionar o  
controlar el sexo de la descendencia para satisfacer rápida-  
mente el deseo de tener un hijo de un sexo particular, redu-  
ciendo el número total de hijos deseados y por lo tanto la  
5 tasa de nacimientos.

El invento proporciona de esta forma un método verda-  
deramente eficaz para controlar el sexo de la descendencia  
de los mamíferos mediante la separación del esperma X y el  
esperma Y en el eyaculado de un mamífero macho, para obtener  
10 fracciones prácticamente puras que contienen esperma X o es-  
perma Y, útiles en la inseminación artificial de la hembra  
para obtener el sexo deseado. También proporciona composicio-  
nes que contienen esperma X prácticamente puro o esperma Y  
prácticamente puro, capaces de producir descendencia de los  
15 mamíferos del sexo deseado.

Con objeto de que el invento pueda ser comprendido más  
claramente, se da la siguiente descripción, simplemente a tí-  
tulo de ejemplo, refiriéndonos a las figuras que acompañan a  
esta memoria, en las cuales:

20 Las Figuras 1 a 3 son representaciones esquemáticas  
de la fase de separación del método y representan la situa-  
ción en tres momentos;

La Figura 4 es una representación gráfica de las dis-  
tribuciones de los tipos X e Y de esperma en una muestra en  
25 función de la densidad del medio en la columna de separación  
a la cual se sedimentan, estando indicada la densidad de la  
columna en las ordenadas de la izquierda, como muestra la  
Figura 3, el número de espermatozoides en abscisas y el porcentaje  
acumulativo total de la muestra de esperma en las ordenadas  
30 de la derecha;



378413

1 La Figura 5 es una ilustración esquemática de una forma de aparato de acuerdo con el invento para ejecutar el método del mismo;

La Figura 6 es una vista en sección y alzada parcial de una realización de aparato de acuerdo con el invento para poner en práctica el método del mismo;

La Figura 7 es una sección y una vista alzada detallada ampliada de una porción del aparato de la Figura 6;

10 La Figura 8 es una sección horizontal a lo largo de las líneas 9-9 de la Figura 7 y

La Figura 9 es una representación esquemática de otra forma de aparato para uso en la puesta en práctica del método del invento.

15 El método del invento incluye las Etapas 1 a 9, que serán descritas a continuación.

En la Etapa 1, se recoge del macho un esperma fresco, conteniendo cantidades aproximadamente iguales de esperma X y esperma Y. Este esperma se mezcla con un medio nutritivo en la Etapa 2 y la mezcla se enfría gradualmente hasta prácticamente inmovilizar el esperma en la Etapa 3. Cuando está fría, la mezcla es procesada en las Etapas 6 y 7 para separar las dos clases de esperma de acuerdo con su densidad. Este procesado se realiza en presencia de un medio de separación, preparado en la Etapa 4 con las características de densidad deseadas. De preferencia, la Etapa 4 produce un medio de separación con un gradiente de densidad uniforme que cubre la gama de densidades de los espermatozoides individuales. El medio de separación preparado se enfría a una temperatura suficiente para inmovilizar el esperma en la Etapa 5. La mezcla enfriada se introduce en la columna para el medio de separación en

20

25

30



1 la Etapa 6. Si el medio de separación tiene un gradiente de  
densidad uniforme, el esperma se introduce en un punto inter-  
medio del gradiente de densidad, con lo que el esperma, sometido  
a las fuerzas de flotación dentro del medio en la Etapa  
5 7, se separa de acuerdo con las densidades de los espermias  
individuales. Las fracciones de esperma se suspenden junto  
a la parte superior e inferior de la columna, facilitando  
con ello la separación de una fracción de esperma de las ca-  
racterísticas sexuales deseadas en la Etapa 8, cuya fracción  
10 puede ser empleada después para inseminar a la hembra, en la  
Etapa 9, para que conciba la descendencia deseada.

Se comprenderá que la fracción de esperma separada  
en la Etapa 8 es generalmente inseminada en la Etapa 9 en la  
hembra de la especie de la cual se ha tomado el esperma, aun-  
15 que, por ejemplo, los caballos pueden ser cruzados con asnos  
y cebras, así como los lobos con perros.

El medio utilizado en las Etapas 6 y 7 debe tener una  
densidad próxima a la del esperma de forma que la ligera di-  
ferencia de densidades entre los espermias X e Y los obligue  
20 a separarse. La viscosidad también debe ser apropiada para  
controlar la separación y el medio no debe dañar o destruir  
al esperma y debe incluir agentes nutritivos para mantener  
el esperma vivo. El medio también debe tener un pH adecuado,  
(6,0 a 8,0) de forma que actúe como regulador. El medio debe  
25 tener las características de un fluido corporal normal y su  
presión osmótica debe ser alrededor de 277 a 280 miliosmos  
para evitar compresiones o expansiones perjudiciales del es-  
perma. En esta memoria, las medidas de pH, densidad y visco-  
sidad se realizan a 0°C.

30 Un medio nutritivo satisfactorio es el derivado de la

378413



1 leche completa de mamíferos y sus componentes. La densidad  
controlada, por ejemplo en la preparación de una columna de  
separación con un gradiente de densidad uniforme, se obtie-  
ne utilizando diversos tipos de leche de vaca. En la prácti-  
ca, se preparan tres medios iniciales con unas densidades me-  
5 dias respectivas de 1,025, 1,035 y 1,044 g/cc aproximadamen-  
te. El medio más ligero se obtiene de un producto lácteo co-  
nocido como "mitad y mitad" (significando que contiene porcio-  
nes aproximadamente iguales de leche homogeneizada y crema  
separada) mezclado con pequeñas cantidades adecuadas de le-  
che homogeneizada normal. El medio de densidad intermedia  
10 (es decir alrededor de 1,034 a 1,038 g/cc) se obtiene mez-  
clando leche homogeneizada con pequeñas cantidades de leche  
no grasa destilada dializada y el medio relativamente denso  
se prepara mezclando una proporción mayor de leche no grasa  
15 destilada dializada con leche homogeneizada. Pueden agregarse  
antibióticos para proteger el esperma.

La leche fresca de mamíferos, como la leche de vaca  
y sus componentes, tienen una viscosidad, una densidad y un  
20 pH (alrededor de 6,4 a 6,8) adecuados para uso en la reali-  
zación del método. La leche de vaca también es, apropiada-  
mente, un fluido corporal normal. Como la leche de vaca es  
aproximadamente isotónica con la sangre del animal de la que  
se extrae, su presión osmótica (u osmolalidad) es también  
25 más fácilmente ajustada a un valor compatible con el del es-  
perma (es decir, alrededor de 276 a 300 miliosmos). Como se  
describirá más adelante, los valores específicos deseados de  
densidad, viscosidad, osmolalidad y pH pueden ser obtenidos  
fácilmente durante las operaciones de preparación de los me-  
30 dios de separación.



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

También se obtienen líquidos nutritivos satisfactorios de otros orígenes mamíferos (v.g. leche humana) o derivados de leche de mamíferos (v.g. leche en polvo). También son satisfactorios los líquidos nutritivos a base de yema de huevo, dextrosa, crema de coco (procedente de cocos verdes), jugo de tomate, glucosa, fructosa, lecitina, aminoácidos, fluidos y extractos corporales vivos, extractos de tejidos (v.g. extracto de hígado) y mezclas de los mismos. La yema de huevo contiene glucosa, fructosa y aminoácidos que proporcionan agentes nutritivos y favorecen la fertilidad. Cuando se utilizan en combinación con glicina, pueden obtenerse los valores deseados de la densidad, viscosidad, pH y osmolalidad. La glicina (preferiblemente en forma de solución acuosa al 2-5 %) sirve como regulador del pH y para hacer descender el punto de congelación de la yema del huevo en el medio. En general, la relación de glicina a yema de huevo depende principalmente de la densidad, viscosidad y osmolalidad iniciales de la yema de huevo. Naturalmente, la relación puede variarse en la medida necesaria para la preparación de un gradiente de densidad uniforme. Como la solución de glicina tiene una viscosidad menor que la yema de huevo, se requerirá más cantidad cuando se necesite también un depresor de la viscosidad. En general, será necesaria una parte de glicina (en forma de solución al 4 %) por cada una a cuatro partes de yema de huevo, según los requisitos de densidad.

Un método de preparación de columnas con gradiente de densidad se realiza con el aparato representado en forma general en 20 en la Figura 5. En este caso, el medio de densidad menor se coloca en el depósito más alto 21 y el medio de densidad intermedia se coloca en el depósito más bajo 22.

378413

9



1 Los dos depósitos, 21 y 22, se suspenden en un sistema de po-  
leas que eleva el depósito 22 a la misma velocidad que hace  
descender al depósito 21. Los depósitos independientes están  
suspendidos de los extremos de una cadena 23 que pasa alrede-  
5 dor de los soportes rotatorios 24 y de la polea propulsora  
25. Toda la unidad está impulsada por el motor 26 a través  
de la transmisión de arranque 27 y del dispositivo de engra-  
naje sin fin 28. El aparato sirve para introducir simultáne-  
neamente los líquidos desde los depósitos 21 y 22 en una cá-  
10 mara de mezcla 29, a caudales determinados por la cabeza  
hidrostática del medio en cada depósito con respecto a la  
cámara de mezcla. Así, el caudal del medio menos denso en  
el depósito 21 comienza en un máximo y disminuye hasta un  
mínimo, cuando alcanza la posición representada por la línea  
15 de puntos 30 y el caudal del medio más denso comienza en un  
mínimo y aumenta hasta un máximo (línea de puntos 31), mien-  
tras que el caudal total a través de la cámara de mezcla 29  
es constante. La mezcla que descarga de la cámara de mezcla  
29 tiene un gradiente de densidad lineal que varía desde la  
20 densidad del medio más ligero a la del medio intermedio. El  
entremezclado de los medios en la cámara 29 se realiza, por  
ejemplo, mediante el agitador mostrado en la Figura 6.

El medio pasa después desde la cámara de mezcla 29  
a través de un serpentín de compensación 32 hasta un con-  
25 ducto múltiple ventilado 33 y de aquí pasa en cantidades  
iguales a la parte inferior de las columnas de separación 34.  
El medio de máxima densidad (1,044 g/cc) se encuentra en un  
tercer depósito 35 desde el que puede ser introducido en las  
paetes inferiores de las columnas 34 a través del conducto  
30 múltiple ventilado independiente 36, bajo el control de las



378413

1      válvulas 37. El medio del depósito 35 se utiliza para ajustar la altura del medio en las columnas 34.

5      Después de haber sido introducido en las columnas, el medio es enfriado gradualmente a una temperatura que inmoviliza al esperma sin dañarlo. El aparato enfriador incluye una unidad de refrigeración 38, un tanque enfriador 39 y una masa de agua enfriadora 40 que contiene glicerol que circula entre la unidad de refrigeración y un tanque a través de los conductos de entrada y salida 41 y 42, respectivamente. La refrigeración de las columnas desde la temperatura ambiente hasta menos de 1°C aproximadamente, dura poco tiempo, desde algunos minutos a algunas horas.

10      Se recoge el esperma fresco y se mezcla con un medio nutritivo del mismo tipo que el medio de separación con una densidad igual a la densidad media del mismo (v.g. alrededor de 1,028 como se ha descrito). El esperma se enfría a menos de 1°C y, como se ilustra en las Figuras 1 y 5, se introduce en las columnas en un punto intermedio, siendo la densidad del esperma más muestra diluyente preferiblemente igual a la del medio de separación en ese punto. Esto puede ser determinado introduciendo una pequeña cantidad del medio nutritivo conteniendo una pequeña cantidad de un colorante y observando su movimiento. De acuerdo con el movimiento, puede introducirse una pequeña cantidad del medio del depósito 15 35 en la columna o puede descargarse una pequeña cantidad del medio de separación a través de las llaves 43, de forma que el medio de densidad correcta se encuentre al nivel de la entrada de mezcla de esperma.

20      En la Figura 5, cada columna 34 tiene una válvula de entrada 45 operable mediante un control 46. El esperma conte

30

378413



1 nido en los depósitos refrigerados 47 se mueve hasta las po-  
siciones adyacentes a las bocas de llenado 48 y se hacen fun-  
5 cionar los controles de válvula 46 para introducir el esper-  
ma a través de los conductos de llenado 49.

5 Dentro de las columnas, las fuerzas de flotación as-  
cendentes y descendentes obligan al esperma menos denso a  
ascender y al esperma más denso a sedimentarse en la colum-  
na como en las Figuras 1 a 3, que muestran la distribución  
a tiempos diferentes. Los espermatozoides individuales quedan final-  
10 mente suspendidos en puntos correspondientes a su densidad,  
es decir donde la densidad del medio de separación es la misma,  
mostrándose esta situación en la Figura 3.

Aunque los espermatozoides X son generalmente más pesados  
que los espermatozoides Y, de hecho se produce una distribución nor-  
15 mal de densidades del tipo de curva de Gauss de cada pobla-  
ción, teniendo las distribuciones diferentes valores medios.  
La Figura 4 es una representación de la distribución de las  
dos poblaciones con respecto a la densidad dentro de una co-  
lumna y la diferencia entre las densidades medias está repre-  
20 sentada por A. Como se indica en las Figuras 3 y 4, es posi-  
ble aislar poblaciones de esperma X e Y prácticamente puras  
en la parte superior e inferior de las columnas, cuyas pobla-  
ciones están mostradas en las zonas 51 y 52. En cada una de  
estas zonas se encuentra menos del 10 % del esperma total,  
25 pero esto constituye un gran número de espermatozoides ya que el  
eyaculado de un mamífero macho contiene normalmente muchos  
millones de espermatozoides y la pequeña proporción es suficiente-  
mente grande en número para permitir la inseminación y la  
concepción. El esperma entremezclado contenido dentro de la  
30 porción intermedia de la columna puede ser utilizado por los

378413



1 criadores de animales y similares para efectuar la inseminación artificial normal.

El tiempo requerido para alcanzar el estado de equilibrio varía solo ligeramente, según el medio de separación  
5 utilizado y entre una separación y otra, siempre que la temperatura y la viscosidad de los medios de separación sean constantes. En general, no son necesarias más de 24 horas para el proceso de separación y normalmente es suficiente de 0,5 a 4 horas, siendo el óptimo alrededor de 2,5 horas.

10 Mientras que un tiempo demasiado corto produce una separación inadecuada y da lugar a fracciones impuras, un tiempo demasiado largo puede dar lugar a la separación del propio medio, separándose iones inorgánicos y otras partículas pesadas. Asimismo, las partículas del medio tienen tendencia a "salificar" o precipitar del fluido después de trans-  
15 currido un tiempo muy superior a 24 horas.

La gama de densidades del esperma de los seres humanos y toros oscila entre 1,01 y 1,19 g/cc aproximadamente, encontrándose la densidad media entre 1,028 y 1,036 g/cc.  
20 En estos casos, la densidad del medio de separación puede variar entre 1,010 y 1,150 g/cc aproximadamente, con una media geométrica de 1,028 g/cc aproximadamente. Si la densidad media es demasiado elevada, el esperma X más pesado tenderá a subir a la parte superior de la columna y mezclarse  
25 con el esperma Y más ligero, mientras que si es demasiado baja, ocurre lo contrario. Esto hace difícil la separación. Por razones análogas, la gama de densidades del medio de separación debe ser suficiente para asegurar una gama completa de ascenso y descenso del esperma.

30 La viscosidad del medio de separación debe estar com



378413

1 preñida también dentro de una gama dada para una separación satisfactoria. En general; la viscosidad del medio de separación está relacionada con la densidad.

5 La Tabla. I contiene la gama de densidades y viscosidades de los medios de separación, adecuadas para uso con el esperma de varias especies de mamíferos y también indica una densidad y una viscosidad media para la separación satisfactoria en una columna de gradiente de densidad. Todos los valores de la Tabla. I fueron determinados a 0°C y se encuentran en g/cc y centipoises respectivamente.

TABLA I

	<u>Densidad</u>			<u>Viscosidad</u>
	<u>Baja</u>	<u>Alta</u>	<u>Media</u>	
Humanos	1,015	1,09	1,017-1,030	2-9
15 Conejos	1,015	1,09	1,022-1,030	2-9
Toros	1,020	1,10	1,027-1,032	2-9

20 La presión osmótica del medio de separación puede variar entre 276 y 300 miliosmos aproximadamente, pero se obtienen los mejores resultados si es alrededor de 280 miliosmos.

25 Dependiendo del medio de separación empleado, la temperatura debe estar comprendida entre -5°C y 2°C aproximadamente. Por debajo de este intervalo de temperatura, las propiedades físicas del medio se alteran de forma que el esperma no asciende o desciende de acuerdo con la densidad, mientras que por encima de dicho intervalo el esperma tiene tendencia a moverse o nadar sin responder a ninguna regla. Si se utiliza leche de mamíferos, la temperatura preferida es 0,8°C.

30 Debe tenerse cuidado de no vibrar el esperma durante



378413

1 el procesado para evitar que las colas se separen del esper-  
ma. Asimismo, la vibración puede afectar al descenso y ascen-  
so durante la etapas de separación 6 y 7. Debe ejercerse un  
cuidado especial durante la Etapa 8, la separación de una  
5 fracción particular de la columna.

La luz afecta a la fertilidad del esperma y debe ser  
excluida. La fertilidad también puede ser afectada por un  
pH elevado o bajo del medio (fuera de los límites 6,0 a 6,8  
para la mayoría de las especies), por la edad del esperma y  
10 por el número de espermias móviles.

Una vez que el esperma ha alcanzado el estado de  
equilibrio, representado en la Figura 3, las fracciones de  
esperma prácticamente puras deseadas deben ser separadas in-  
mediatamente de la parte superior o inferior de la columna  
15 y preservadas para la inseminación artificial. Con el aparato  
de la Figura 5, las fracciones de esperma X se extraen  
de la parte inferior de las columnas 34 a través de las lla-  
ves 43, convenientemente gota a gota, transcurriendo alrede-  
dor de 5 a 10 segundos entre cada gota. La fracción de esper-  
20 ma Y en la parte superior de la columna se obtiene vaciando  
la columna completa. Alternativamente, la fracción de esper-  
ma Y puede ser separada inicialmente de la parte superior de  
la columna, por ejemplo empleando una bureta provista de una  
pipeta de Pasteur.

25 La Figura 6 muestra un aparato de columna que es útil  
porque permite la separación de la fracción de esperma Y más  
alta de la parte superior de la columna. Como se indica en  
las Figuras 7 y 8 este aparato comprende una columna cilín-  
drica 60, con aperturas 62 a través de su longitud, cada una  
30 de las cuales está en comunicación con una válvula 64 que con



378413

1 trola la descarga de una fracción en unos viales receptores  
66 soportados sobre la columna mediante los soportes 67 y  
las pinzas 68. Como puede verse en la Figura 7, cada apertura  
62 está cerrada por un elemento de válvula sesgada de resor-  
5 te 70 que funciona mediante una varilla de tracción 72. Las  
varillas de tracción pueden ser sacadas hacia afuera median-  
ta los botones 74 para descargar una fracción de esperma a  
través de la boca 76 en el vial 66. Las aperturas 62 están  
10 dispuestas a lo largo de la columna de forma que es posible  
separar fracciones muy pequeñas o tomar fracciones mayores ha-  
ciendo funcionar una válvula 64 un poco más abajo de la co-  
lumna.

Como muestra la Figura 6, la válvula 64 puede ser abier-  
ta automáticamente mediante la varilla operada por una leva y  
15 el manipulador 76, 78. Este último está adaptado para engra-  
nar entre el botón 74 y el cuerpo de una válvula 64, para  
tirar de la válvula 70 hacia afuera. Como muestra la Figura 6,  
cada uno de los manipuladores 76 y 78 está provisto de un se-  
guidor de leva sesgado de resorte 79 que coopera con las le-  
20 vas rotatorias 80 y 82 en la parte superior e inferior de la  
columna, respectivamente. Los manipuladores de leva pueden  
girar a una velocidad previamente determinada mediante unos  
medios propulsores para efectuar la serie de operaciones de-  
seadas con el mecanismo de válvulas 64. El número y la posi-  
25 ción de los manipuladores de válvula 68 con respecto a los  
mecanismos de leva puede ser seleccionado para que resulte  
apropiado para una separación particular.

La Figura 6 ilustra la columna 60 dentro de una cáma-  
ra de refrigeración. El enfriamiento de las columnas en esta  
30 realización se consigue mediante una atmósfera gaseosa seca



378413

1 por ejemplo aire frío y seco a una temperatura inferior a  
1°C aproximadamente. El gas refrigerado puede ser proporcio-  
nado, por ejemplo, por la cámara de refrigeración 86 y el  
impulsor 88, que suministra gas a la cámara de enfriamiento  
5 90 a través del conducto 92. El gas refrigerante descargado  
por la salida 94 puede ser recuperado. La columna 60 se uti-  
liza por lo demás de forma análoga a las columnas 34, sien-  
do las válvulas 96 y 98 las contrapartidas de los conductos  
múltiples 33 y 36 en el aparato de la Figura 5. Las válvulas  
10 96, 98 y los conductos asociados 100 y 102 comunican con las  
aperturas de la parte inferior de las columnas 60.

Quando se utiliza el aparato de las Figuras 6 a 8,  
las columnas 60 se llenan con el medio de separación prepara-  
do en la forma antes descrita y después se enfrían mediante  
15 la unidad de refrigeración y el sistema de circulación 86,  
88. Se preparan las muestras de esperma y se enfrían como  
antes, inyectándolas a través del conducto 49 y la válvula  
45 en el punto de densidad media, que corresponde a la den-  
sidad de la muestra de esperma. Cuando se alcanza el equili-  
20 brio, se energizan los mecanismos de leva para los manipula-  
dores de válvula 78 para que inicien la extracción de las  
fracciones de esperma. Preferiblemente, se sacan primero las  
fracciones a través de válvulas sucesivamente más bajas des-  
de la parte superior de la columna para dar fracciones prác-  
ticamente puras del esperma menos denso (esperma Y). La por-  
25 ción central de la columna 60 se vacía después a través de  
una válvula sencilla (v.g. 106 en la Figura 6) y las fraccio-  
nes más bajas del esperma más denso (esperma X) se sacan a  
través de válvulas sucesivamente más bajas. Los mecanismos  
30 de leva pueden ser actuados para realizar esta función en un



378413

1 tiempo adecuado.

5 La extracción de las fracciones puede ser favorecida suministrando un gas bajo una presión positiva de 0,1 a 10 psi (7,03 a 703 g/cm<sup>2</sup>), por ejemplo, sobre el medio de separación contenido en la columna 60. Puede utilizarse aire frío y seco o un gas inerte y el método tiene la máxima utilidad, por ejemplo, durante la descarga de las fracciones intermedias a través de la válvula 106.

10 En la preparación de la columna de gradiente de densidad pueden utilizarse otras técnicas. Por ejemplo, se puede preparar un medio de leche tratando la leche homogeneizada en una ultracentrífuga que puede girar a más de 1000 vueltas por minuto y que distribuye las moléculas de forma que la solución es más densa al aumentar la distancia al eje de la centrífuga. El medio de leche con un gradiente de densidad  
15 adecuado puede ser preparado en tiempos relativamente cortos con las centrifugas de laboratorio normales, sin cambiar la osmolalidad de los medios. Los límites del gradiente de densidad pueden ser controlados variando el contenido en grasa  
20 de la mezcla inicial.

Existen procedimientos más sencillos para preparar columnas con gradiente de densidad, por ejemplo como el ilustrado en la Figura 9 en el que unas vasijas 110 y 112 conectadas entre sí se descargan simultáneamente a través de las  
25 válvulas 114 y 116. El líquido denso de la vasija 110 pasa a la parte inferior de la vasija 112 que contiene el líquido menos denso y en la que se mezclan mediante el agitador 118. La mezcla atraviesa el tubo 122 hasta la parte inferior de la columna 120. Si la velocidad a la que el líquido más  
30 denso pasa desde la vasija 110 es la mitad de la velocidad

378413-9



1 a la que la mezcla sale de la vasija 112, se obtiene un  
gradiente de densidad lineal en la columna 120. También se  
puede conseguir un gradiente lineal con el tiempo si se vier  
te un líquido menos denso sobre un líquido más denso ya con  
5 tenido en una columna. La difusión entre los líquidos misci-  
bles reduce la definición de la zona de transición y puede  
conseguirse un gradiente prácticamente lineal. Una agitación  
suave de la zona de transición acelera este proceso.

10 Como muestran las Figuras 3 y 4, que son típicas pa-  
ra las especies de mamíferos mencionadas, es posible obte-  
ner fracciones prácticamente puras de esperma X y esperma Y.  
Para que el uso de este método sea económico, deben obtenerse  
y utilizarse fracciones que contengan de 70 a 80 % de un ti-  
po de esperma, mientras que las fracciones que tienen 90 %  
15 de un tipo constituyen la probabilidad estadística tolera-  
ble de obtener descendencia del sexo deseado. Las muestras  
con un 100 % de uno de los tipos son evidentemente las mejo-  
res y pueden ser obtenidas en la práctica, reduciéndose ca-  
si a cero la probabilidad de obtener una descendencia del  
20 sexo no deseado. Con este método pueden obtenerse muestras  
de grados variables de pureza.

25 Es conveniente determinar la densidad de la solución  
de diversas fracciones y un procedimiento adecuado para ello  
es una multiplicidad de depósitos conteniendo soluciones de  
densidades conocidas (v.g. de sulfato de cobre) en las que  
se introducen unas gotitas del medio. Otro procedimiento con-  
siste en emplear una multiplicidad de hidrómetros en la co-  
luna de separación para determinar la densidad a determina-  
dos niveles dentro de la columna sin tomar muestras para  
30 su ensayo.



378413

1           La densidad de la leche o de los fluidos corporales  
de mamíferos está relacionada con su opacidad que puede ser  
medida y registrada utilizando una fuente luminosa u otra  
fuente de radiación, una célula fotoeléctrica para recibir  
5           la radiación que atraviesa el medio, un amplificador y un  
registro. De esta forma puede ser determinada la posición  
de las capas de separación del esperma.

10           La posición de las capas de separación también puede  
ser determinada midiendo la conductividad en diversos puntos  
de la columna, utilizando electrodos en la columna a diver-  
sas alturas a lo largo de la misma. La conductividad de las  
fracciones de esperma separadas es diferente de la del me-  
dio de soporte.

15           Otros métodos de determinar la posición de las frac-  
ciones de esperma separadas incluyen el uso de un microden-  
símetro, que mide la densidad utilizando luz polarizada y  
técnicas microscópicas que miden la dispersión de la luz  
polarizada.

20           En lugar de la bureta puede utilizarse un tubo de ge-  
latina como columna de separación. Cuando se alcanza el equi-  
librio, se puede enfriar el tubo y su contenido a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por  
ejemplo, de forma que las fracciones de esperma separadas se  
congelan in situ y el tubo y su contenido se pueden cortar  
de acuerdo con las fracciones deseadas. Es posible el alma-  
cenamiento de las fracciones durante periodos relativamente  
25           largos.

30           La aplicación de una presión de gas negativa sobre la  
superficie del medio de separación en la columna, consiguien-  
do el efecto cartesiano, ayuda a las fuerzas de flotación a  
separar los tipos de esperma en el caso en que sus densida-



1 des sean sólo ligeramente diferentes. Se ha encontrado que  
cuando se aplica un vacío a un espacio situado encima de  
la columna de medio, la densidad aparente de ambos tipos  
de esperma disminuye, disminuyendo más la del tipo Y que  
5 la del tipo X. Esta disminución de la densidad aparente  
no se ha explicado claramente, pero puede ser explicada con  
el postulado de que el espermatozoide tiene un exterior  
elástico de forma que su densidad es sensible a los cambios  
de presión en el espacio situado sobre la columna, porque  
10 el medio es incompresible y transmite las variaciones de  
presión. Las eficiencias de separación pueden ser aumenta-  
das en un 30 a un 50 % por aplicación de un vacío de 25,4  
a 50,8 de mercurio, aproximadamente, en el espacio situado  
sobre la columna de medio de separación. El vacío debe ser  
15 aplicado gradualmente, por ejemplo alcanzando un equivalen-  
te a 38 cm de mercurio en unos 5 minutos. Preferiblemente,  
la bomba de vacío se pone en marcha después de haber intro-  
ducido el esperma y manteniendo el vacío durante toda la  
fase de separación. El vacío debe ser eliminado a lo largo  
20 de un periodo de 2 minutos como mínimo, antes de sacar las  
fracciones de esperma.

El invento es ilustrado mediante los siguientes ejem-  
plos.

EJEMPLO 1

25 Se prepara un medio de separación en forma de una co-  
lumna con gradiente de densidad a partir de leche de vaca  
comercial, calentándola inicialmente a 32,2°C, enfriando a  
la temperatura ambiente (v.g. 22,2°C) y filtrando todos los  
materiales de partida (es decir, leche comercial homogenei-  
30 zada, mitad y mitad, leche no grasa destilada y leche baja



378413

1 en grasa) a través de lana de vidrio esterilizada, aproxima-  
 5 madamente a la temperatura ambiente. Después de enfriar,  
 cada uno de los componentes puede ser tratado con antibió-  
 10 ticos adecuados (v.g. penicilina G potásica y solución de  
 sulfato de estreptomocina). En el caso de la leche no gra-  
 15 sa, la densidad puede ser aumentada, sin variación importan-  
 te en la presión osmótica, por diálisis para separar las  
 diversas sales orgánicas e inorgánicas y sin reducción del  
 contenido en proteína u otro deterioro de la leche. La le-  
 che es bidestilada a vacío para separar el exceso de agua,  
 consiguiendo así la densidad mayor. Por ejemplo, se obtie-  
 ne el efecto deseado mediante diálisis en un equipo de  
 diálisis de laboratorio (v.g. el dializador múltiple Oxford)  
 durante periodos de 10 a 15 horas, seguido de bidestilación  
 a 58°C durante unas 3 a 10 horas. Utilizando este procedi-  
 miento, se obtienen las siguientes densidades y presiones  
 osmóticas típicas.

	<u>Medios</u>	<u>Osmolalidad</u>	<u>Densidad</u>
	Mitad y mitad	280	1,024
20	Leche homogeneizada	280	1,034
	Leche baja en grasa	348	1,043
	Leche no grasa destilada	214	1,049

25 Para obtener las densidades y osmolalidades deseadas  
 se utilizan mezclas de los medios citados. Así, se mezcla  
 leche baja en grasa con leche no grasa destilada para ob-  
 tener una mezcla con una osmolalidad de 280 aproximadamente  
 y una densidad considerablemente superior a la densidad má-  
 xima deseada de 1,044 g/cc. Análogamente, se mezcla mitad  
 y mitad con leche homogeneizada para obtener una mezcla con  
 30 una osmolalidad compatible y una densidad deseada de 1,028

378413



1 g/cc. Estas mezclas se combinan ahora para formar un me-  
dio con la densidad máxima deseada de 1,044 g/cc. Siguien-  
do este procedimiento, se obtienen fácilmente medios de la  
densidad deseada a 0°C para uso en la formación de un gra-  
5 diente de densidad de acuerdo con los procedimientos ante-  
riores, por ejemplo como el de la Figura 6.

El esperma recién recogido se combina con una mezcla  
de leche homogeneizada y mitad y mitad de densidad cono-  
cida (v.g. 1,0295) en las proporciones necesarias para  
10 proporcionar una población de unos 200 a 300 millones de  
esperma por centímetro cúbico de medio, proporcionando la  
muestra total de 400 a 600 millones de espermias como mí-  
nimo. La mezcla de esperma y medio nutritivo se enfría des-  
pués gradualmente en una cámara fría hasta cerca de 0°C  
15 (es decir, 0,8°C).

La muestra de esperma se introduce en el "punto cen-  
tral" de la columna de gradiente de densidad, determinan-  
do primero la situación dentro de la columna de la zona  
de densidad media correspondiente a la de la muestra de  
20 esperma que va a ser sometida a separación (v.g. 1,028).  
Este punto es localizado fácilmente inyectando una peque-  
ña cantidad de un agente colorante en una porción diferen-  
te de medio de una densidad de 1,028, por ejemplo, e intro-  
duciendo esta pequeña cantidad de medio coloreado a tra-  
25 vés de la válvula de entrada 45 a una porción central de  
la columna. Después se ajusta verticalmente el estrato de  
densidad 1,028 (determinado por el color) dentro de la co-  
lumna hasta un punto opuesto a la válvula de entrada 45  
(Figura 5).

30 La columna de gradiente de densidad se enfría a la

378413<sup>9</sup>



1 temperatura de separación deseada ( $0,8^{\circ}\text{C}$ ) y después se in-  
troduce la muestra de esperma a través de la boca de llena-  
do 48 y del tubo 49 en el punto central de la columna de  
gradiente de densidad. A continuación se produce la sepa-  
5 ración del esperma de acuerdo con la densidad mediante los  
efectos de flotación del medio de gradiente de densidad,  
haciendo que el esperma menos denso ascienda y el esperma  
más denso descienda dentro de la columna de gradiente de  
densidad. Transcurrido un periodo de tiempo suficiente pa-  
ra alcanzar el equilibrio (v.g. alrededor de 2,5 horas),  
10 se separa una fracción de esperma de la parte superior o  
inferior de la columna (según la selección hecha) para ob-  
tener un medio nutritivo que contiene una fracción de esper-  
ma que constituye del 4 al 8 % de la población de esperma  
total en la muestra introducida. En el caso del esperma X,  
15 la fracción de esperma se separa de la parte inferior de la  
columna por cualquiera de los métodos previamente descritos.

20 Cuando se desea el esperma Y, la fracción de esperma  
se separa análogamente de la parte superior de la columna.  
En la práctica, la fracción separada se cuenta para deter-  
minar el número de espermias presentes en la misma y este  
número se representa en función de la fracción.

EJEMPLO 2

25 En este ejemplo se realiza un número de separaciones  
(superior a 50) utilizando el aparato de la Figura 5. Se  
preparan simultáneamente una serie de columnas de gradiente  
de densidad en cada una de las columnas 44. El gradiente de  
densidad en cada columna está comprendido entre 1,0255 en  
la parte superior y 1,044 en la parte inferior (conseguido  
30 mediante el uso de un medio con una densidad de 1,0255 en



1 el depósito 21 y de 1,036 en el depósito 22). Después se  
deja transcurrir un tiempo suficiente (30 minutos) para que  
las columnas de gradiente de densidad se enfríen a la tem-  
5 peratura del baño de agua 40 del tanque de refrigeración  
39 (0,8°C). La altura de la columna se ajusta para presen-  
tar una densidad de 1,0295 en el punto de entrada opuesto  
al mecanismo de válvula 45.

10 Antes de iniciar la separación, se recoge esperma fres-  
co de toro y se mezcla con un medio nutritivo con una den-  
sidad de 1,0295 aproximadamente, después de lo cual se  
ajusta la densidad del esperma y el medio nutritivo mezcla-  
dos a un valor final de 1,0295, agregando medio de densidad  
mayor o menor según sea necesario. El esperma y el medio  
15 nutritivo se enfrían después durante 2 horas aproximadamen-  
te para enfriar gradualmente el esperma hasta una tempe-  
ratura de inmovilización de 1°C (es decir 0,8°C). Se intro-  
ducen unas muestras de esperma conteniendo aproximadamente  
480 millones de espermas (v.g. 1 a 2,5 cc de esperma mez-  
clado con medio nutritivo) en las columnas de separación  
20 individuales a través de los tubos laterales 49 y de los me-  
canismos de válvula 45, utilizando una jeringa hipodérmica  
47 enfriada a la temperatura de inmovilización del esperma  
de 0,8°C. El esperma se introduce en la columna a velocidad  
relativamente lenta, no pasando de 1 cc por minuto aproxi-  
25 madamente y bajo luz infrarroja. Para asegurarse de que  
todo el esperma ha sido introducido en las columnas, se ha-  
ce pasar adicionalmente una pequeña cantidad de medio nu-  
tritivo a través de los tubos laterales 49, enjuagando así  
los tubos laterales de esperma. El tanque de refrigeración  
30 y las columnas de separación se cubren para excluir la luz

378413<sup>9</sup>



1

durante el proceso de separación. La separación del esperma se produce mediante la actuación de las fuerzas de flotación dentro de las columnas de gradiente de densidad durante 1 a 4 horas (óptimo, 2,5 horas) y después, con una

5

luz atenuada, se separan las fracciones de esperma de la parte superior de las columnas mediante unas pipetas provistas de trompas de agua (descritas anteriormente) después de lo cual la fracción de esperma más densa se retira de la parte inferior de las columnas (representada en 34), a través de las llaves 43 situadas en el fondo de las columnas. Para garantizar la pureza de las fracciones separadas, las porciones retiradas de las partes superiores e inferiores de las columnas de gradiente de densidad se matienen a un volumen de 0,5 cc aproximadamente.

10

15

También se separan unas fracciones de esperma mixtas de las porciones centrales de la columna. Todas las muestras de esperma son después sometidas a recuento del número de espermias, utilizando un procedimiento normal con un hemacitómetro.

20

25

Una mezcla de fracciones separadas de esperma relativamente puro (0,5 cc) y una pequeña cantidad (0,165 cc) de glicerol al 15 % en leche homogeneizada se mantiene durante 15 minutos a 1-8°C. Después se agregan 0,165 cc adicionales de glicerol y la mezcla se mantiene a 1-8°C durante un periodo adicional de 15 minutos, después de lo cual se realiza una tercera adición de glicerol (0,165 cc) a la mezcla. Se seleccionan unas muestras para inseminación entre la población de espermias en el fondo del tubo que representa menos del 4,5 % de la población total. Las muestras recogidas de esperma se congelan después profundamente utilizando

30

378413



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

procedimientos normales como los practicados habitualmente en la industria de la inseminación artificial.

Cuando es necesario, las muestras de esperma preparadas en la forma descrita se sacan de su almacenamiento en frío y se utilizan en la inseminación artificial de mamíferos hembra. Por ejemplo, las vacas en celo se inseminan por procedimientos normales con 1 a 2 cc conteniendo como mínimo de 10 a 20 millones de espermatozoides (antes de la congelación). La pureza del esperma, determinada por ensayos de laboratorio, es superior al 70 % con el procedimiento descrito.

Del total de vacas, quedaron 13 preñadas y sus fetos fueron matados y examinados después de 60 días aproximadamente, con los resultados mostrados en la Tabla II.

TABLA II

<u>Prueba</u>	<u>Fecha de inseminación</u>	<u>Resultado</u>
1	15-V-67	H
2	6-VI-67	H
3	27-I-68	H
4	6-VI-68	H
5	23-VII-68	H
6	24-VII-68	H
7	24-VII-68	H
8	27-VII-68 *	M x 2 <sup>1</sup>
9	1-VIII-68 **	H x 2 <sup>2</sup>
10	4-VIII-68	H
11	6-VIII-68	M
12	7-VIII-68	H
13	8-VIII-68	M

\* esta muestra fué utilizada en 2 vacas y cada una de ellas produjo un ternero.

\*\* en esta prueba, se obtuvieron 2 terneras gemelas.



378413

1

Analizando los resultados, la Prueba 8 fué tratada como si se hubiera producido un ternero y la Prueba 9 fué tratada como si se hubiera producido una sola ternera. Debe observarse que se esperaban 13 terneras y que realmente se obtuvieron 10 terneras y 3 machos. Esto representa una desviación estadísticamente significativa de la relación normal de sexos en las vacas.

5

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

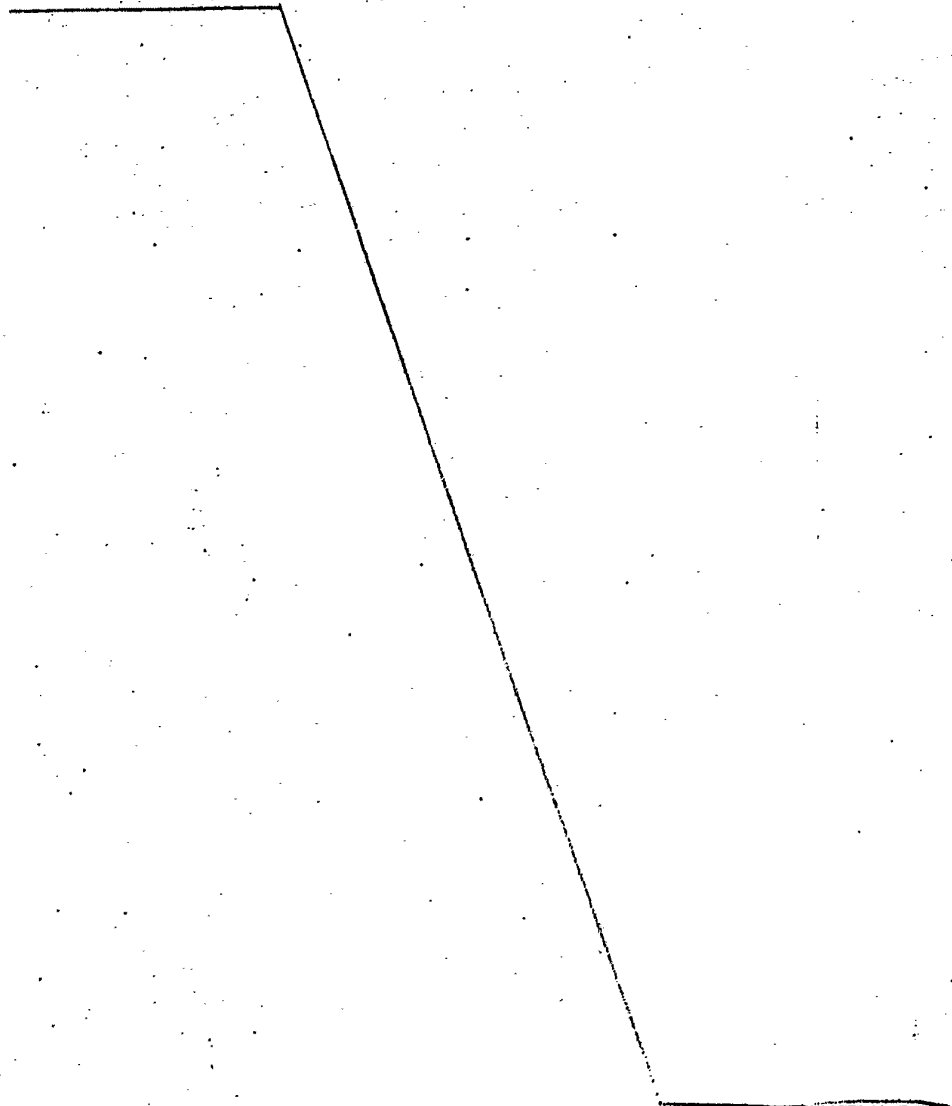
10

15

20

25

30



378413

REIVINDICACIONES

1  
5  
10  
15

1. Método y aparato para regular el sexo de la descendencia en los mamíferos mediante fraccionamiento del esperma, a utilizar preferentemente en la cría industrial del ganado, cuyo método consiste en enfriar una mezcla del esperma y un medio nutritivo para inmovilizar sustancialmente el esperma; e introducir la mezcla en un medio de separación que comprende un medio nutritivo; cuyo método se caracteriza esencialmente porque el medio de separación tiene una densidad no-uniforme, teniendo una parte del medio de separación una densidad sustancialmente igual a la densidad de la mezcla, por introducir dicha mezcla dentro de dicha parte del medio de separación y permitir la separación del esperma y la suspensión del mismo a diferentes niveles en el medio de separación.

20

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de separación tiene un gradiente de densidad uniforme en el que la densidad más baja se encuentra en la parte superior y la densidad más elevada se encuentra en la parte inferior y en el que preferiblemente la mezcla se introduce en un punto intermedio en el gradiente de densidad de forma que el esperma menos denso ascienda y el esperma más denso descienda en el medio de separación.

25  
30

3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque el medio de separación es sometido a una presión de gas negativa, preferiblemente mediante un vacío de hasta 50,8 cm de mercurio, especialmente alrededor de 38 cm de presión de mercurio, para reducir la densidad aparente del esperma con respecto al medio de separación.

378413



1 ración o en el que el medio de separación es sometido a una presión de gas positivo para aumentar la densidad aparente del esperma con respecto al medio de separación.

5 4... Método según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque el esperma es de primates, preferiblemente humanos, ganado vacuno, cerdos, ovejas, conejos, búfalos, cabras, perros, gatos o caballos.

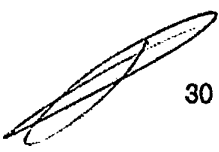
10 5. Método según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque todas las porciones del medio de separación tienen una densidad de 1,01 a 1,15 g/cc a 0°C.

15 6. Método según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque el esperma es separado durante 0,5 a 24 horas, y preferiblemente durante alrededor de 2,5 horas.

20 7. Aparato para llevar a cabo el método de la reivindicación 1 del tipo que incluye una columna sustancialmente vertical para contener el medio de separación, cuya columna está rodeada por un dispositivo de enfriamiento y provista de una conexión o entrada controlada a válvula en su parte inferior; caracterizándose dicho aparato porque la columna está provista de una entrada o toma controlada por válvula y adyacente a su altura media para la introducción del esperma en un medio nutritivo, y porque dicho aparato incluye un dispositivo de alimentación proporcional que regula el paso del medio de separación de sus depósitos respectivos para medios de separación de diferentes densidades a la columna y porque comprende dispositivos de extracción de fracciones controladas del esperma dispuestos

25

30



378413



1 sobre la columna por encima y por debajo de la citada toma.

5 8. Aparato según la reivindicación 7, caracterizado porque comprende unos manipuladores que actúan los dispositivos de extracción de fracciones y una levas adyacentes a la columna que gobierna los manipuladores.

10 9. Aparato según la reivindicación 7 o 8, caracterizado porque los dispositivos de alimentación indicados incluyen una polea que soporta un cable unido a los citados depósitos, unos tubos situados entre los depósitos y una cámara de mezcla y un dispositivo propulsor para la polea para elevar y descender respectivamente los depósitos con respecto a la cámara de mezcla que están conectados a la conexión situada en la parte inferior de la columna.

15 10. Aparato según la reivindicación 9, caracterizado por comprender un tercer depósito para el medio de separación, cuyo depósito presenta una conexión controlada por válvula y enlazada con la conexión situada en la parte inferior de la columna.

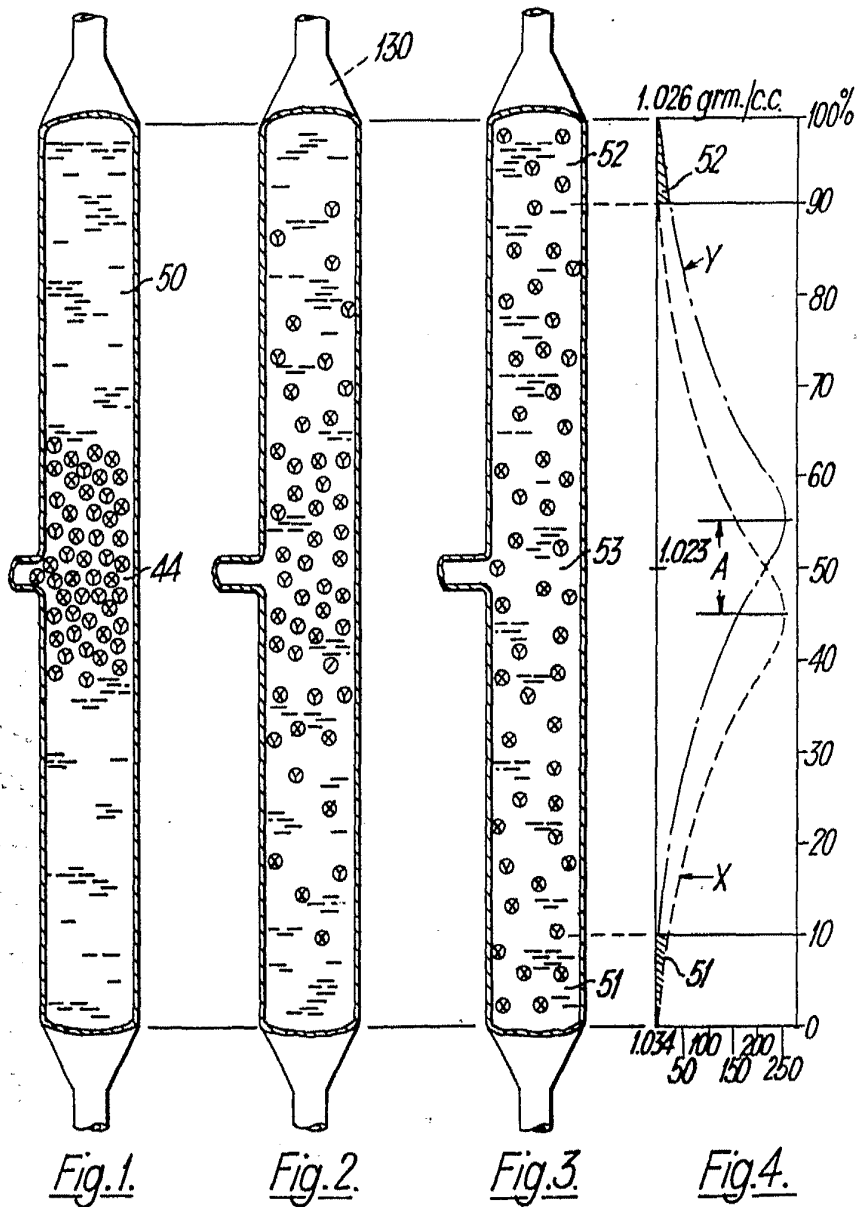
20 11. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "METODO Y APARATO PARA REGULAR EL SEXO DE LA DESCENDENCIA EN LOS MAMIFEROS MEDIANTE FRACCIONAMIENTO DEL ESPERMA".

25 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de treinta-y-tres páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

Madrid, 9 Abril 1970

BERNARDO UNGRIA  
P.P.

378413



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 9 abril de 1.970  
BERNARDO UNGRIA  
P.D.

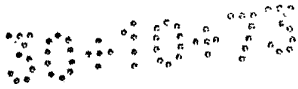


Fig. 9.

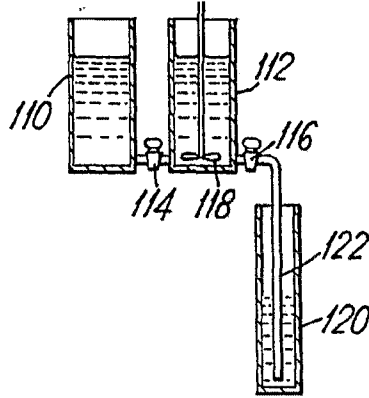
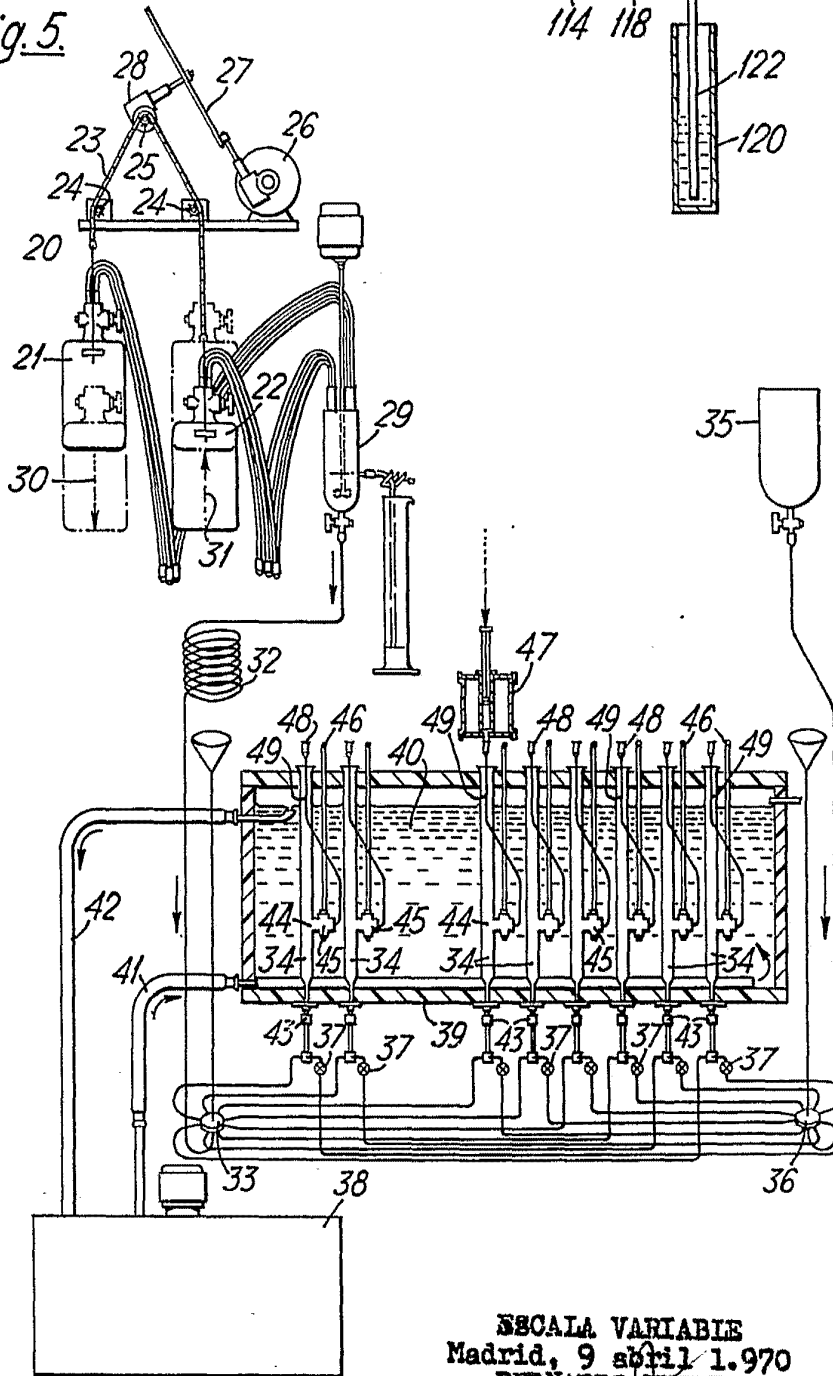


Fig. 5.



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 9 abril 1.970  
BERNARDO UNGHERA

P.D.

378413

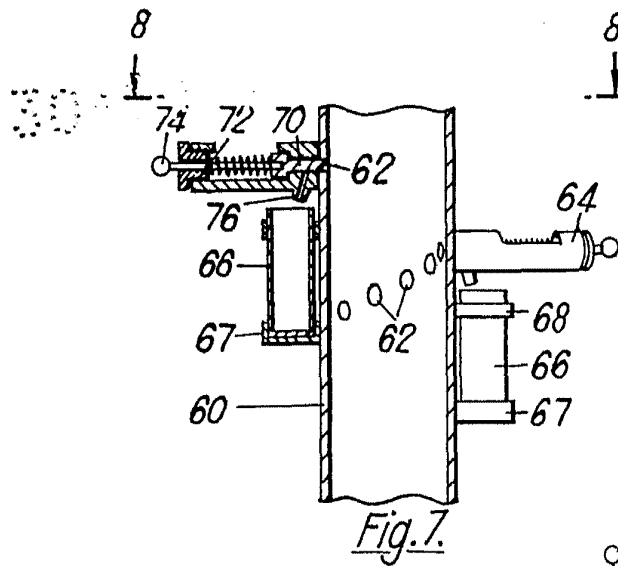


Fig. 7.

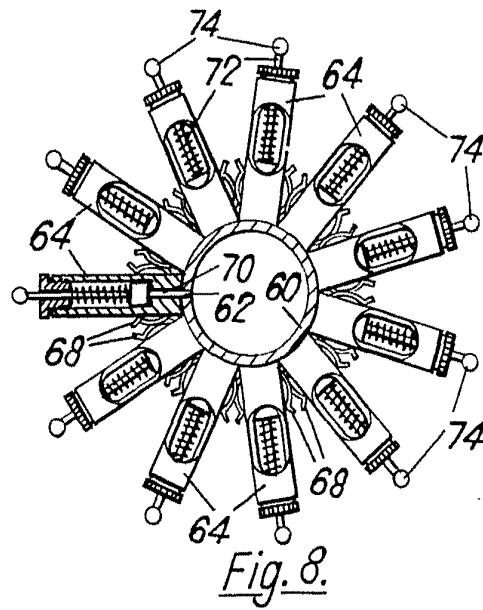


Fig. 8.

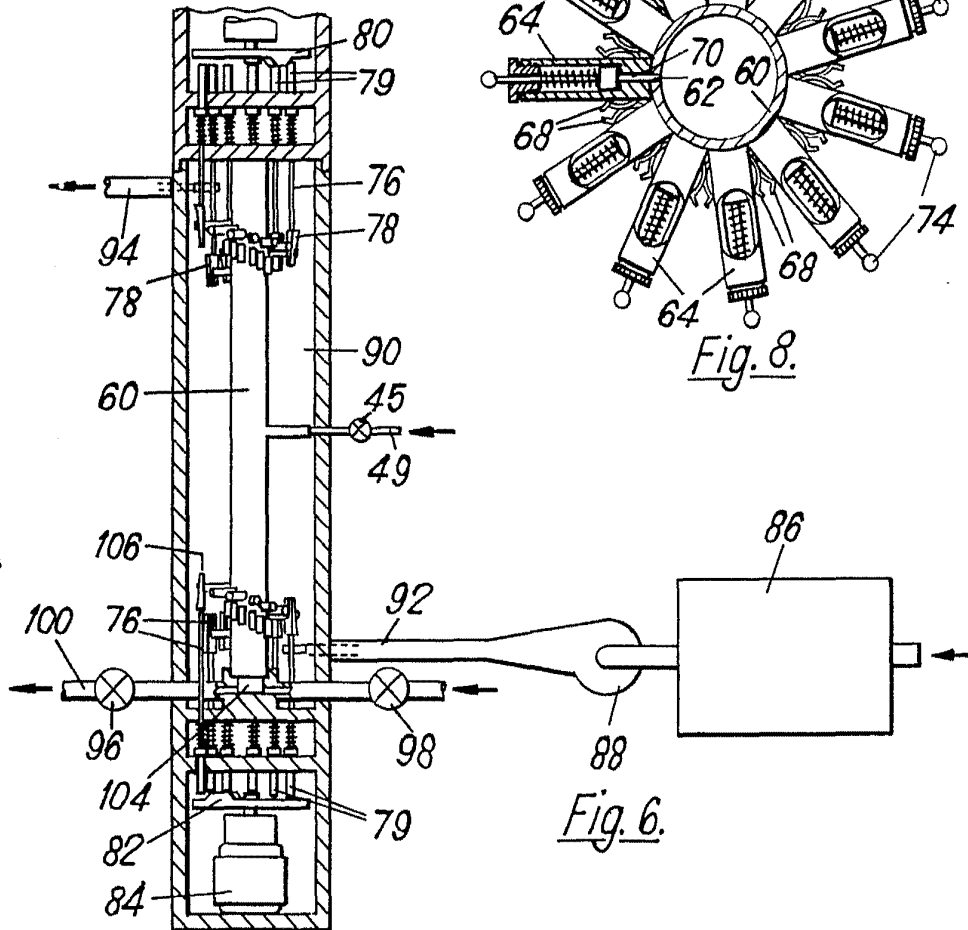


Fig. 6.

ESCALA VARIABLE  
 Madrid, 9 abril de 1.970  
 BERNARDO UNGRIA

*[Handwritten signature]*