

CATEDRA DE CIRUGIA, PATOLOGIA QUIRURGICA Y OBSTETRICIA

Catedrático: **FELIX PEREZ PEREZ**

Investigaciones en torno al efecto del dienestrol sobre la vitalidad y morfología espermática

Prof. Dr. Félix Pérez y Pérez

Uno de los aspectos más interesantes planteados inicialmente en Inseminación Artificial Ganadera fué el de la conservación "in vitro" del espermatozoide en óptimas condiciones sanitarias, biológicas y de capacidad fecundante. Han sido verdaderamente cuantiosas las experiencias encaminadas al efecto y en la mayoría de los casos han servido a su vez de base a otros tantos métodos más o menos convenientes, para la conservación "in vitro" del material espermático.

Hoffman en Alemania (1905), propugna el empleo de la leche para dilución del espermatozoide; este método proporcionaba excelentes resultados como medio diluidor, debido a las siguientes condiciones favorables a la vitalidad del espermatozoide que presenta el medio en cuestión:

- a) Cierta viscosidad
- b) Cierta capacidad tampón.
- c) Contenido en material energético.
- d) Acción antiséptica inicial.

El método de Hoffman, no pudo sin embargo llegar más le-

jos que como menstuo diluidor y nunca como conservador, puesto que la leche se alteraba con facilidad (fermentación láctica) y se transformaba en un tóxico espermático; sin embargo estas experiencias sirvieron de base a la moderna aplicación de la leche en la diluyococonservación del esperma.

Ivanov en 1910, experimenta con éxito en la dilución espermática las soluciones del cloruro sódico y potásico isotónicas; en 1913 adiciona a aquellos medios bicarbonato sódico al 0,5%, obteniendo resultados aceptables, cuando se aplicaban en inseminación inmediata, llegando a conseguir un tiempo de conservación hasta de 72 horas en el esperma de toro. El efecto de determinados electrolitos sobre el espermatozoide, no había sido considerado todavía, y ello fué la causa del fracaso de los menstuos apuntados, así como el de las soluciones citofilácticas de Ringer, Locke, Pirochi, etc., como medios conservadores.

Las soluciones espermio-conservadoras comienzan a usarse en 1914, cuando Poyarkoy demuestra el efecto favorable de la glucosa en la biología espermática; sin embargo el uso de aquella tuvo poco éxito, hasta que en 1920 Wolf introduce el empleo de los tapones a los líquidos de conservación espermática. A partir de esta época, comienzan a prepararse una gran variedad de menstuos dilio-conservadores, manejando estos dos aspectos: Aporte de material energético y neutralización de los catabolitos tóxicos (tamponización).

El interés científico del problema de la dilución conservadora del esperma, adquiere proporciones verdaderamente sorprendentes en los países más interesados por este nuevo método de reproducción animal. Así en 1928 se definen claramente dos Escuelas: la rusa, con su sede en el Instituto de Inseminación Artificial Ganadera de Moscú, representada por los Investigadores Milovanov y Salivanova principalmente, y la japonesa localizada en la Universidad de Tokio con los investigadores Toma, Sato y Schimamura, además de Yamme y otros en el Instituto de Zootecnia de la localidad de Hokkaido.

La escuela rusa investiga sobre la glucosa y sustancias tampón, en otros casos simplemente con electrolitos y soluciones subalcalinas; llegando a la conclusión en cuanto al uso de la glucosa, que era suficiente para los équidos la concentración del 4,5 a 5% y en los bóvidos y óvidos, cantidades del orden de 5-6 gramos por cien. Por lo que se refiere al empleo de sustancias tampón concluyen en recomendar el fosfato bisódico y el monopotásico, en proporción variable en cada caso, pero en general oscilando del 0,08 a 2,08 gr. por cien.

La escuela japonesa investigó principalmente sobre el empleo en los medios diluidores de productos orgánicos. Uramoto

y Ochi probaron con diversos líquidos (extractos de órganos), hasta definir como más aceptables el líquido cerebro-espinal, el humor vítreo y el estrato testicular y como francamente tóxicos a todos los procedentes del aparato digestivo; Yamane preparó estratos de músculos, cerebro, hígado, etc., y obtuvo con ellos resultados mediocres, a excepción de los francamente aceptables conseguidos con el hígado y el estrato del tejido nervioso. Sin embargo, los métodos de diluyo-conservación a base de estratos orgánicos no prevalecieron en la práctica corriente y ello, por las siguientes causas: costosa preparación, difícil conservación y frecuente contaminación. Producto de la investigación de la Escuela Japonesa, son también una serie de menstuos a base de azúcar, tampón y estratos testiculares, de buen resultado práctico.

La Escuela Alemana, representada por Wolmelinstar y Roemmule, se preocupa fundamentalmente de la investigación sobre el efecto de los electrolitos en el eyaculado normal y líquidos conservadores artificialmente preparados; Wolmeinster llega a la conclusión de catalogar en dos series de acción protectora y tóxica a los distintos electrolitos, que fué base de una serie de medios a base de cloruro sódico, bicarbonato sódico y fosfatos en especial concentración, según fuesen destinados a una u otra especie. El referido autor alemán, preconizó al mismo tiempo el empleo de los sulfatos como protectores de la morfología espermática, en las especies de gran habilidad al efecto (Equina y Suina); en los équidos y cerdo llega a admitir que las concentraciones de sulfato sódico del 1,7 al 1,9% eran suficientes para garantizar la protección de los espermatozoides frente a los electrolitos, siendo necesario para el mismo efecto concentraciones inferiores en el caso de los rumiantes.

Miller y Schote, experimentan con sustancias orgánicas lecitinas, pectonas, en la concentración de 1-5-10 gr. por 1000 para los rumiantes y de 15 a 20 gr. en los équidos y suidos; llegando a la conclusión de que estas sustancias presentan cierta acción tampón que aunque no excluye el uso de los propios tampones, proporciona al mismo tiempo material nutritivo al espermatozoide, así como cierta viscosidad al medio en que aquellos se desenvuelven.

La gelatinización del esperma marca una etapa interesantísima en la diluyo-conservación del esperma, nace esta idea en 1934 con Datwyler, Sato y Roemmele, al observar el efecto beneficioso del aumento de la viscosidad en los menstuos; Milovanov, Nagorny, Tazunnow, Sivokon y Malakor, han preparado distintos medios en cuya fórmula entra la gelatinización del esperma, tiene la fórmula siguiente:

$\text{PO}_4 \text{H}_2\text{Na} + 12\text{H}_2\text{O} = 2,08 \text{ grs.}$
 $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K} \dots\dots\dots = 0,08 \text{ grs.}$
 Glucoso anhidrido.... = 3,20 grs.
 Gelatina oro..... = 5 grs.
 Agua..... = 100 grs.

Los primeros resultados prácticos obtenidos con el esperma gelatinizado, fueron comunicados en 1937 por Olbrycht al Congreso de Dresde. Sorensen en Dinamarca, ha experimentado modificando esta técnica en el sentido de aumentar la concentración de gelatina, a fin de obtener un efecto más rápido y definitivo en la mezcla a gelatinizar; la adición de aquella sustancia la hace a 25° centígrados y a continuación se embala en tubitos de celofán. Bonadonna, ha utilizado con éxito desde 1939 la adición de gelatina a 10% sobre el menstuo que a su vez llevaba yema de huevo.

Paul Phillips en 1939, preparó un medio para diluir el esperma que fué rápidamente aceptado en casi todos los países del mundo, estaba formado de yema de huevos fresca a partes iguales con una solución M/12 de fosfato sódico, bibásico y fosfato potásico monobásico, Wilcznca y Laurans en 1947 demostraron la resistencia que la yema de huevo proporciona a los espermatozoides, frente a los antisépticos, en cuyo mecanismo basan la mayoría de los autores las grandes propiedades de capacidad fecundante que proporciona el monstuo de Phillips.

Salisbury introduce una notable modificación al método de Phillips consistente en sustituir los fosfatos por citrato sódico, de este modo se evitaba la tendencia a aglutinar que presentaban los espermatozoides en el método de Phillips, disolviéndose más finamente las gotitas de lípidos procedentes de la yema del huevo y permitiendo por otra parte una visibilidad más clara en el campo de la observación microscópica. Por otra parte el citrato sódico presenta otros efectos interesantes: protección sobre la cápsula espermatida (capuchón cefálico) acción tampón marcada y efecto claramente anticoagulante; el método de Salisbury descubierto en el State of agriculture del Cornell University (New York), y formado por yema de huevo fresca a partes iguales con citrato sódico M/15, mantenía en condiciones de alta fecundidad al esperma hasta más allá del 5.º día de su conservación en nevera a 5° centígrados.

En 1948 Berustein y Killseff demostraron el efecto favorable del suero hormo-testicular procedente de la coagulación de la sangre, previamente recogida en la vena gran testicular, añadido a 5 % sobre el medio de conservación. Frank y Smith experimentaron en 1914 con resultados favorables, la adición a los mé-

todos de conservación espermática de extractos de tejido embrionario de pollo, a los 10-13 días de desarrollo, Mexner y Yohuston descubrieron el efecto favorable de la hialuronidasa descubierta por Durán Reynals en 1929, en relación con el aumento de capacidad fecundante del material en el que iba disuelta, llegando a establecer relación directa entre su existencia y la capacidad fecunda; los Doctores Caretta y Fiorentino demostraron en 1950 un ligero aumento de la capacidad fecundante del esperma de toro al añadir 0,1 gr, por 10. c. c. de material seminal.

Knoop y Salisbury en 1947, emplearon por vez primera una sulfamida en los disolventes espermáticos a fin de prevenir el desarrollo bacteriano de gérmenes banales u específicos de naturaleza diversa. Milkhalov en 1949 empleó la leche hervida durante seis minutos y filtrada después, para diluir el esperma de équidos, obteniendo un resultado práctico aceptable en las inseminaciones inmediatas a la dilución; Thacker y Akquist en 1950, obtuvieron magníficos resultados en cuanto a conservación y capacidad fecundante del esperma, disolviéndole con leche pasteurizada y Jaoquet y Lapland aseguran la obtención de resultados aceptables con el empleo al mismo efecto de leche descremada y mantenida a pH 6-8.

Alberto Fiorentino en una comunicación presentada al Congreso Internacional de Copenhague (Julio 1952), señala las ventajas en la conservación del esperma del empleo de leche totalmente descremada, filtrada de amianto y tinalizada a 90° C. a fin de evitar la precipitación de las sales de calcio y conservada después en nevera. Este método reúne la ventaja además, de la liberación previa de la materia grasa en la leche, de utilizar un medio estéril y reducir a cero el número de gérmenes contenidos en el mismo. En cuanto al empleo de antibióticos, la dosis precisada en tal caso, es de 5.000 u. o. por % ct. de penicilina y de 5 mg. de estreptomycin, en vez de cantidades superiores exigidas cuando se emplea disolvente de Salisbury (dada la resistencia que la yema confiere a los gérmenes frente al antibiótico).

A la numerosa relación de menstuos diluyocconservadores de material espermático, podría añadirse otra no menos corta en relación con los modernos conceptos sobre adición de fermentos y vitaminas a los referidos medios. En todo caso la pretensión de estos menstuos, no va más allá que proporcionar a los espermatozoides condiciones a ser posible óptimas para el mantenimiento de toda su potencialidad biológica, contando con la ayuda para su conservación de las temperaturas de 2 a 5° C.

Las iniciales experiencias de Jahnel en 1949, dieron fundamento a los maravillosos trabajos de Polge y Rowsn en relación con la conservación del esperma congelado a menos de 70°

centígrados y la conservación de la vitalidad de los espermatozoides durante periodos superiores a los 365 días.

Todavía y a pesar de las buenas impresiones que se recogen de los trabajos presentados al Congreso de Inseminación Artificial y Esterilidad de Cambridge, (Julio 1956), en relación con la conservación del esperma, resulta muy prematuro hablar de óptima capacidad fecundante en material congelado - conservado; hasta ahora nos hemos contentado con suponer que cualquier fallo en la tecnología de la congelación, podía ser responsable del índice subnormal de fecundación que generalmente se apreciaba en este material espermático congelado. Pero no sabemos hasta cuándo quedará por descubrir el fallo de algún factor importante en el mecanismo íntimo de la conjugación de los gametos, o de los pronúcleos, que por su labilidad especial se haya desnaturalizado o destruido en el curso de la congelación prolongada.

El problema de la conservación del esperma, parece totalmente resuelto tras la eficacia anabiotica de la congelación, observándose sin embargo, cada vez más claramente la existencia de un doble aspecto: el del mantenimiento y conservación de la motilidad (actividad de los espermatozoides) y el de la conservación de la capacidad fecundante en los mismos; la motilidad y actividad cinética en general de la célula espermática, resulta bastante satisfactoria tras la conservación por congelación a menos 70° c., esta motilidad parece, no obstante, sólo un síntoma de capacidad fecundante, siendo aquella función mucho más sutil y posiblemente ausente, aún en zoospermos perfectamente móviles y vigorosos.

Después de los trabajos fundamentales sobre el fermento Hialuromidasa, y la conservación del esperma de Mexner y Johuston, Favilli, Chag, Caratta, Fiorentino y Félix Pérez, se llega a la conclusión de que a los espermatozoides de las especies mamíferas, puede interpretárseles como vectores del hialuronidasa; fermento que liberado de los referidos vectores frente al óvulo, determina la destrucción (despolimerización) del mucoide (cúmulo ooforo) que envuelve al mismo, haciendo posible de este modo la última consecuencia de la conjugación de los gametos (impregnación) o penetración del espermatozoide en el óvulo. Dependiendo la capacidad fecundante del espermatozoide en su casi totalidad de la propia dotación, bajo sus estructuras en fermento y hialuronidasa, resulta de extraordinario interés el estudio de las diversas circunstancias que a través del periodo conservatorio del esperma, puedan modificar la actividad del referido fermento. En nuestro trabajo "hialuronidasa" y vitamina C" (Anales Facultad de Veterinaria de León 1955), se deducen conclusiones interesantes en cuanto al efecto que sobre la con-

servación del esperma determina la acción antagónica de la vitamina C y la hialuromidasa; en el presente trabajo nos proponemos analizar el comportamiento de un estrógeno sintético como representante de otros del mismo grupo, sobre el mantenimiento de la motilidad y normoestructura en los espermatozoides conservados en un medio clásico y por tanto, de influencia conocida en cuanto a los aspectos biológicos que pretendemos analizar.

II

ASPECTO EXPERIMENTAL

a) **Primera experiencia.**— Al esperma recién recolectado, procedente de toros normo-funcionales y previamente contrastado lo diluimos al 1-5 en citrato de yema (Salisbury) y a 11 c. c. de medio espermático citrato yema, añadimos 1 c. c. de solución tampón-fosfato (pH=6,8) en cuyo medio habíamos disuelto inmediatamente antes 0,1 miligramos de 3,4 p. p. dihidroxifenil 2-4 hexadieno (dienestrol). la totalidad del volumen se ha separado en dos partes que le conservan a la temperatura y a nevera (2,5 gr. C.) respectivamente, junto a sendos testigos sin adición de estrógeno.

La experiencia se ha repetido 10 veces con intervalos variables y en esperma procedente de cinco toros normales; la media de los resultados obtenidos en material conservado en nevera, y

Tabla nº 1

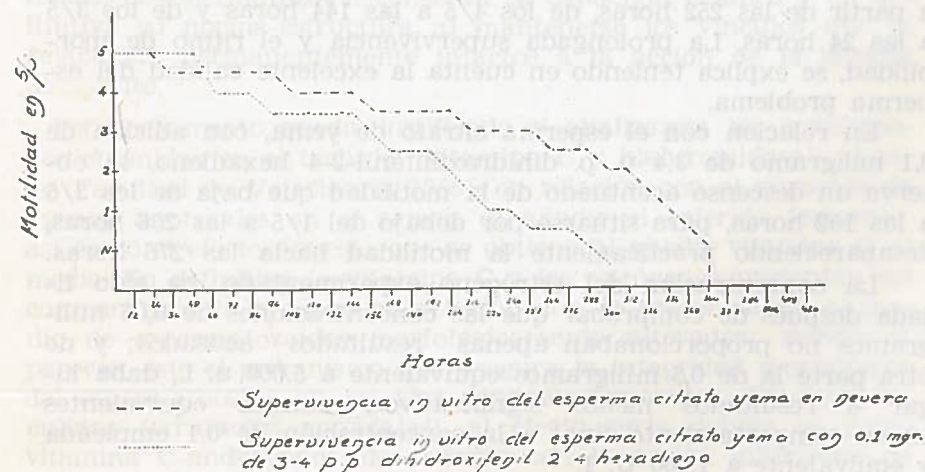
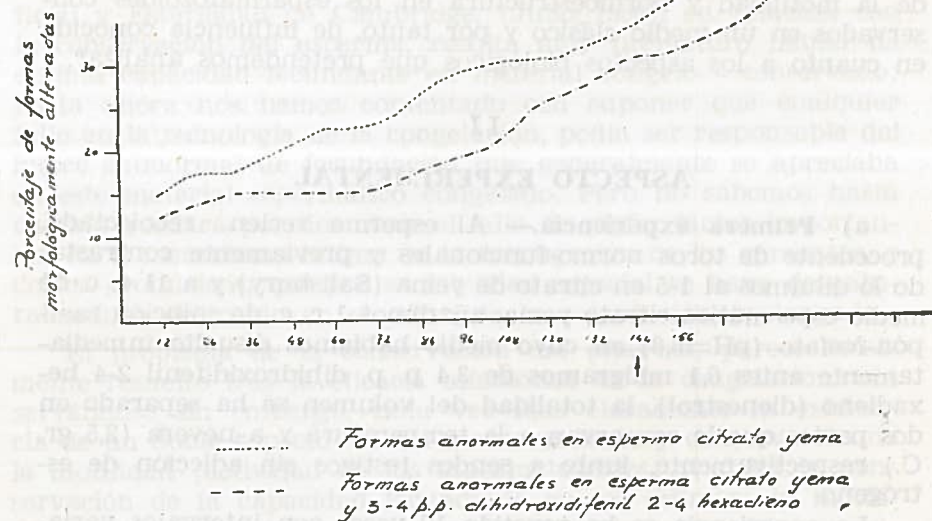


Tabla nº 2



en controles realizados cada 12 horas, queda resumida en las tablas números 1 y II.

Discusión.—Se observa que la supervivencia de material en nevera adquiere su máximo mantenimiento en una totalidad de 360 horas, si bien a partir de las 288, la motilidad no llega al 40 % de los espermatozoides; habiendo descendido de la motilidad 3/5 a partir de las 252 horas, de los 4/5 a las 144 horas y de los 3/5 a las 24 horas. La prolongada supervivencia y el ritmo de morbilidad, se explica teniendo en cuenta la excelente calidad del esperma problema.

En relación con el esperma citrato de yema, con adición de 0,1 miligramo de 3,4 p. p. dihidroxidifenil-2-4 hexadieno, se observa un descenso acentuado de la motilidad que baja de los 3/5 a las 192 horas, para situarse por debajo del 1/5 a las 256 horas, desapareciendo prácticamente la motilidad hacia las 276 horas.

La concentración del estrógeno experimentado, ha sido fijada después de comprobar que las concentraciones de 0,05 miligramos no proporcionaban apenas resultados acusados; y de otra parte la de 0,5 miligramos equivalente a 5.000 u. i., daba lugar a resultados menos significativos, aunque equivalentes en su comportamiento final a la concentración de 0,1 empleada y equivalente a 1.000 U. I.

La tamponización del medio a pesar de trabajar con el menstruo citrato con yema, la hemos llevado a cabo a fin de asegurar en todo momento la alcalinidad o como máximo la neutralidad del mismo; de otro modo determinante posible de necropermia apreciada por otras causas en el curso de las experiencias. En definitiva se aprecia que la pérdida de motilidad, sigue con marcado paralelismo el ritmo del esperma citrato (testigo), si bien en tono más acusado, alcanzando un tiempo de conservación 60 a 80 horas menor que el testigo. El mantenimiento inicial (hasta las 192 horas) de una motilidad aceptable, y la caída brusca de aquella sucesivamente, puede interpretarse como debida a la pérdida de actividad del estrógeno en el medio espermático, ya que las demás condiciones de tamponización etc. resultan idénticas en ambos medios.

Si analizamos la tabla número II, en relación con el porcentaje de formas morfológicamente alteradas (entendiendo como tales a la pérdida de capuchón cefálico, cabeza, cola), se observa un fenómeno a primera vista paradójico, en relación con el ritmo de morbilidad que nos ofrece la tabla número 1; de este modo, resulta que mientras adquiere mayor porcentaje de formas muertas el medio esperma-nitrato-yema-estrógeno, en número de espermatozoides morfológicamente alterados resulta inferior al que presenta el medio sin adición de estrógenos.

Se observa por otra parte una marcada acción protectora del dienestrol experimentado, sobre la morfología espermática. El mecanismo de este fenómeno radica a nuestro entender en el efecto antagónico que los estrógenos tienen sobre la acción biológica de la hialuromidasa; por lo que al quedar el fermento en latencia, el espermatozoide conserva su capuchón cefálico y en definitiva su norma-estructura al mantenerse los vínculos que la relacionan permanentemente intactos a la acción de la enzima disolvente.

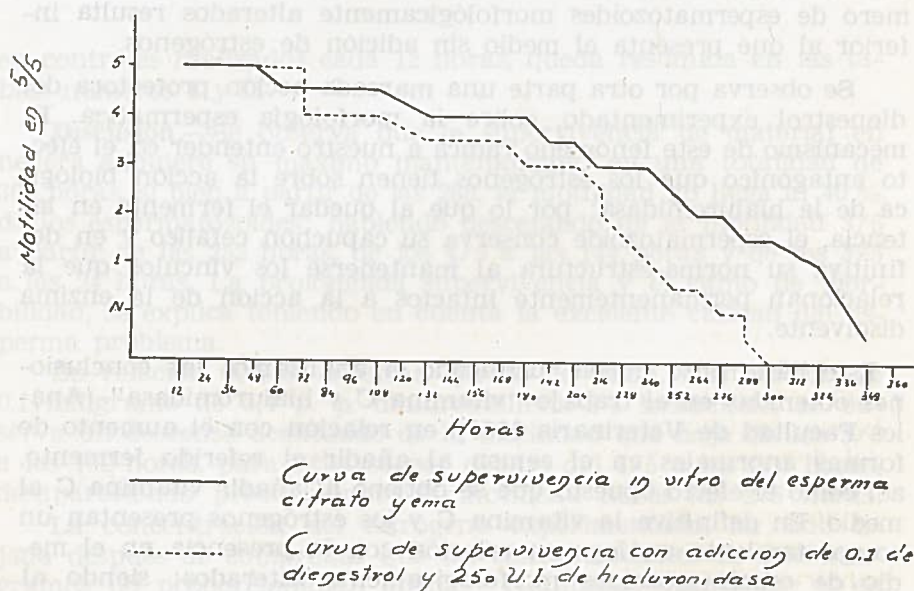
Este basamento queda justificado si analizamos las conclusiones obtenidas en el trabajo "vitamina C y hialuromidasa" (Anales Facultad de Veterinaria 1955), en relación con el aumento de formas anormales en el semen al añadir el referido fermento, así como el efecto opuesto que se obtiene al añadir vitamina C al medio. En definitiva la vitamina C y los estrógenos presentan un comportamiento análogo en relación con la presencia en el medio de espermatozoides morfológicamente alterados; siendo al parecer, este el mecanismo que asegura la integridad morfológica del espermatozoide en las vías genitales femeninas. En las masculinas (conductos gonadales), el efecto sería debido al juego vitamina C-andrógenos, de acuerdo con la acción inhibidora de

aquellos sobre la hialuronidasa descubierta por Watterbegr y Glyck en 1949.

b) **Segunda experiencia.**—Se pretende demostrar el efecto del dienestrol anteriormente experimentado, frente al mismo medio espermático al que añadimos al mismo tiempo 250 u. v. de hialuronidasa. Para ello, de la mezcla esperma de óptima calidad citrato-yema al 1:5, se toman 10 c. c. a los que añadimos un 1 c. c. de solución tampón que lleva disuelto 0,1 miligramo de dienestrol y 250 u. v. de hialuronidasa; dejando un testigo sin fermento.

Lo mismo que en las experiencias anteriores, se procede a continuación al acondicionamiento térmico en conservación a 5° C. en nevera, realizando los controles microscópicos de motilidad y morfología (tinciones) cada 12 horas. En la tabla núm. III y IV, se rejeja el comportamiento medio de 50 experiencias realizadas sobre material espermático procedente de cinco toros en normo-función sexual.

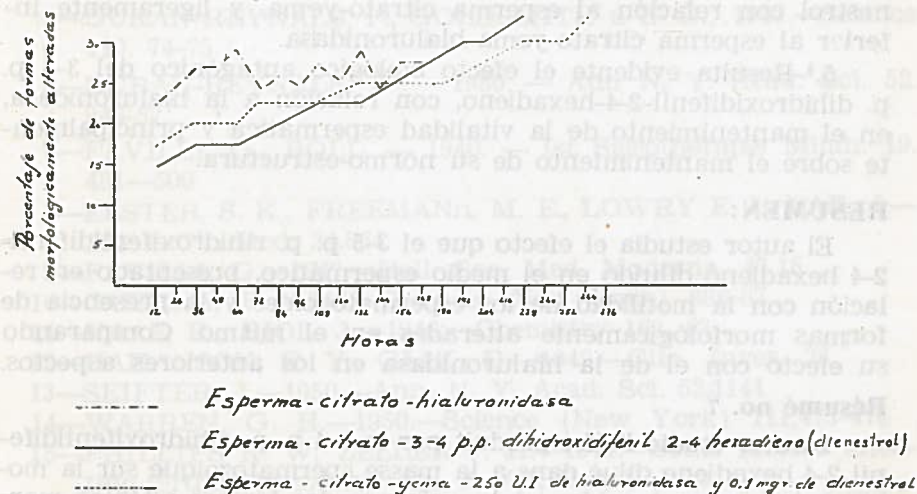
Tabla nº 3



Discusión.—El comportamiento de la motilidad espermática frente al 3-4 p. p. dihidroxi-difenil 2-4, hexadieno y la hialuronidasa es muy próximo al obtenido simplemente con la adición

del estrógeno, si bien, la curva de motilidad determinada por la hialuronidasa resulta muy inferior (ver vitamina C. y Hialuronidasa-Anales Facultad de Veterinaria 1955-Tabla núm. 2). La rectificación de aquel comportamiento por el dienestrol, resulta francamente evidente. Este fenómeno viene a confirmar el señalado efecto antagónico del estrógeno experimentado y la hialuronidasa.

Tabla nº 4



El porcentaje de formas morfológicamente alteradas que aparecen en el medio citrato-yema-dienestrol-hialuronidasa, reflejado en la tabla núm. IV, nos demuestra un comportamiento desde luego inferior al observado tras la adición simplemente del dienestrol (Tabla núm. II) y más próximo al comportamiento que se observa con la adición aislada al medio espermático de hialuronidasa (Anales Facultad de Veterinaria 1955-Gráfico núm. III). La no identificación de estas gráficas explica el efecto moderador del dienestrol; el aumento en alteraciones morfológicas, parece radicar en la rapidez de acción del fermento que se anticipa en su acción al efecto inhibidor del dienestrol.

Conclusiones.—1.ª—La adición de 0,1 miligramos de 3,4 p. p. dihidroxi-difenil 2-4, exadieno (dienestrol) a 10 c. c. de esperma de toro diluido con Salisbury al 1:5, más 1 c. c. de solución tamponizada (fosfato sódico potásico) reduce a la supervivencia total de los espermatozoides conservados a 2-5 grados centígrados de 60 a 90 horas.

2.^a—El porcentaje de formas morfológicamente alteradas resulta notablemente disminuida al añadir la concentración señalada de estrógeno, en relación con el disolvente de Salisbury en el orden del 5-6%.

3.^a—La adicción conjunta al señalado volumen espermático, de 0.1 miligramos de diestrol y 250 u. v. de hialuronidasa, apenas modifica el comportamiento obtenido por el diestrol aisladamente; mejorando el resultado en relación con el efecto aislado de la hialuronidasa sobre las formas morfológicamente alteradas.

4.^a—El porcentaje de formas morfológicamente alteradas resulta inferior cuando se añade la concentración señalada de diestrol con relación al esperma citrato-yema, y ligeramente inferior al esperma citrato-yema-hialuronidasa.

5.^a—Resulta evidente el efecto biológico antagónico del 3-4 p. p. dihidroxifenil-2-4-hexadieno, con relación a la hialuronidasa, en el mantenimiento de la vitalidad espermática y principalmente sobre el mantenimiento de su normo-estructura.

RESUMEN:

El autor estudia el efecto que el 3-5 p. p. dihidroxifenildifenil-2-4 hexadieno diluido en el medio espermático, presentado en relación con la motilidad de los espermatozoides y la presencia de formas morfológicamente alteradas en el mismo. Comparando su efecto con el de la hialuronidasa en los anteriores aspectos.

Résumé no. 7

L'auteur étudie l'effet produit par le 3-4 p. p. dihydroxifenildifenil-2-4 hexadiene dilué dans la masse spermatozoïque sur la mobilité des spermatozoïdes, et la présence des formes altérées morphologiquement contenues dans cette masse. Après cela il compare ce résultat avec l'effet sur la hialuronidase dans ses aspects antérieurs.

Inhaltsangabe No. 7

Der Verfasser studiert hier die Wirkung welche das 3 bis 4 p. p. Dihydroxifenildifenil 2 bis 4 Hexadin, aufgelöst in der Spermamasse, in Bezug auf die Mobilität der Spermatozoiden und das Vorhandensein von morphologisch veränderten Formen in denselben darstellt. Nach Ermittlung dieses Ergebnisses vergleicht er mit diesem die Wirkung auf Hialuronidase in ihrer fuhzeitigen Workommensart.

Summary No. 7

The author is studying the effect which the three-to-four p. p. dihydroxifenildifenil two-to-four hexadiene diluted in the spermatic medium represents in connection with the motility of the

spermatozoides and the presence of morphologically altered forms in the same. After which he compares this result with the effect obtained on the hialuronidase in its anterior aspects.

BIBLIOGRAFIA

- 1—AUSTIN, C. R.—1948. Nature, Che. Abstr. Vol—42.
- 3—CHANG, M. C.—1947. Proc. Soc. exr. Biol. Med. 66.51-54
- 3—CHANG, M. C.—1953. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1192-95
- 4—BERHAMINI, L.—1949.—Chem. Abstr. vol 43
- 5—DURAN-REYNALS, F., GOLDSMITH u E. D.; 1949.—Science 110. 74-75
- 6—DURAN-REYNALS, F. — 1950. — Ann N, Y. Acad. Sci. 52. 946-57.
- 7—FAVILLI, G., BOLL. — 1940. — Ist Sierotherapie Milan. 19. 481—500
- 8—ELSTER, S. K., FREEMANN, M. E., LOWRY E. L. LAB, J.— 1949.—Cli. Med. 34.834
- 9—FAVILLI, G.—1947.—Boll. Soc. Med. Moderna. 47,15
- 10—GUERRA, F.—1946.—Science (New York) 686-87
- 11—HAAS, E., BIOL, J.—1946.—Chemistry 163, 63
- 12—HAKANSON, E. Y., GLIK, D.—1949.—Clin. Inves. 28.
- 13—SEIFTER, J.—1950.—Ann. N. Y. Acad. Sci. 52,1141
- 14—WARREN, G. H.—1950.—Science (New York) 111,473-474
- 15—PHILLIPS R. W, ZELLER J. H.—1941.—Some factors affecting fertility in swinw. Am. J. Vet, Res, Vol 2n, 5
- 16—BONADONNA, T.—1952.—Il material seminale, Collano tecnico feientifica Le Spalanzani n. 7.
- 17—MIKHAGLOV, N. N—1949.—Milk as a semen diluent; Vet. Bull. vol. 21 núm. 2
- 18—HAARDIS, DAYRYMAN,—1950,—A new semen diulter milk; Vet. Bull. núm, 19
- 19—JAEQUE, J. 1951.—Richerches sur quelques milieux biologiques de conservation du sperme de taureau; Bull. Acad. Vet. Vol. 24. 8
- 20—FIORENTINO, A.—1954.—L'emploi du lait e'creme dans la dilution du sperme de taureau.—The II. International Congress of Phy and Pathol. Of Ann. Rep.
- 21—HAENDENSON, J. A.; MAEPHERSON, J. W.—1956,—The use of semen in Rontine insemination of cattle.—III Intenational Congress on animal Reproduction.—Cambrigde
- 22—GALGE e. ROWSON.—1956.—Lon tem storage of bull semen Frozen at verp Lon Tempeaturres 79°. C.—Rp. Int. Cony. Phys. Pat. Anim. Reprod. Cambridge.

- 23—GOLGE, e.—1956.—Techniques for Artificial Insemination in Figs A. Q. e. Unit of reproduction Physiologi and Biochemistry Animal Research et Station.—Hemitig an Road. 20-27-1. Cambrigde
- 24—CHADDACH. T. T.—1950.—Proper technique and value, of sperm chekking.—Amer. Fur. Breder. Vol. 23
- 25—BLOM, E.—1950.—The evaluation of bull semen with special reference of eit emplo y ment for Artificial Insemination Amer Fur. Breder. Vol 17.
- 26—CURTO, J. A.—1953.—Del'influenza di Talune vitamine ed ormoni sulla conservation della vitamita dei nemaspermi di Bos-taurus.—Atti. S. It. della Se. Vet. Vol.—VII
- 27—FIORENTINO, A.—1953.—Uteriore ricerche sulla diluzione del Materiale Spermatico con latte serenato tuorio d'no vo ed antibiotic.—Atti. S. Dt. della Sec. Vet. VII
- 28—REPOSI, S., OLGATI, L. Assernaliccionl sull'attivitá Frut toistica ni vitro dei menospermi de testicolo e delle ampolle semi nifere di Bos-taurus.—Atti. S It. della Sc. Vet. Vol. VII
- 29—PEREZ y PEREZ, F.—1955.—Hialurodinasa y Vitamina C.—Anales Fac. Vet. de León