CATEDRA DE CIRUGIA Y OBSTETRICIA
Catedrático: DR. FÉLIX PÉREZ Y PÉREZ

NUEVAS APORTACIONES EN TORNO AL EFECTO DEL DIENESTOL EN LA BIOLOGÍA ESPERMÁTICA

Por el Dr. Félix Pérez y Pérez

De la serie de investigaciones que en relación con la biología espermática venimos realizando a base de experimentar con fermentos (Hialuronidasa), vitaminas (ácido ascórbico) y hormonas (estrógenos), hemos podido deducir conclusiones que en definitiva han contribuído a aclarar en mucho el mecanismo íntimo de la conjugación de los gametos; significando algunas de ellas auténticas posibilidades de aplicación práctica a la conservación in vitro del esperma, en óptimas condiciones de capacidad fecundante de los espermatozoides.

En el trabajo publicado en los anales de la Facultad de Veterinaria de León (1955), titulado "Hialuronidasa y Vitamina C", se dieron a conocer los resultados correspondientes a la primera fase de estas investigaciones, demostrándose en primer término, que la adición de hialuronidasas al esperma reducía el tiempo de supervivencia de los espermatozoides, al mismo tiempo que aumentaba entre aquellos el porcentaje de formas anormales; radicando esta anormalidad principalmente en el desprendimiento del capuchón cefálico. Fenómeno que se acentuaba en las muestras conservadas a 30 grados centígrados.

La hialuronidasa fué descubierta por DURAN-REYNALS (1928), en los extractos acuosos del tejido testicular del toro. Mas tarde BERGAMINI y FAVILLI, valoran la concentración del referido fermento en el esperma del toro, caballo, cerdo y aves, observando que los valores iniciales (en

todo caso muy bajos), iban aumentando a medida que transcurría el tiempo de conservación in vitro del esperma. Se puede admitir sin embargo, la existencia de una cierta concentración de hialuronidasa en el líquido espermático independiente de la localizada endozooespérmicamente, situada según DELGARD y MIKKELSE entre el capuchón cefálico y el acrosoma.

La concentración definitiva en hialuronidasa del esperma, se establece, como mínimo a las 20 horas de conservación in vitro y a base, de la difusión del fermento endozooespérmico a través de la masa total del eyaculado. Radicando en el propio espermatozoide (GREENNBERG, RIZATTI y VENDAMINI) la principal fuente de hialuronidasa.

En definitiva, biológicamente, puede interpretarse al espermatozoide como vector (entre otras cosas) de fermento hialuronidasa, que lanzará al ambiente en el momento oportuno o de máximas posibilidades de éxito. El fenómeno que CHANG (1951) llamó "Capacitation of manmalian sperms" y al que hoy se le concede gran importancia en el mecanismo de la conjugación de los gametos, quedaría interpretado como la hipocinesis espermática necesaria para dar tiempo a la liberación del fermento en el medio ambiente desde su situación endoespérmica, seguido de la fase de hiperquinesis, probablemente consecuencia del aprovechamiento de la energía liberada en la despolimerización del complejo mucoide que envuelve al óvulo (ver gráfico número 1 de la señalada publicación).

Después de estas consideraciones resulta lógico suponer que la hialuronidasa endospérmica debe estar inhibida en condiciones normales (al menos hasta que el espermatozoide alcanza la senectud) en los órganos del aparato genital masculino, por efecto de algún inhibidor biológico específico de otra parte quedaría comprometida el mantenimiento de la integridad estructural de los espermatozoides. En realidad, el envejecimiento espermático radica morfológicamente en la pérdida del capuchón cefálico y funcionalmente en la de la hialuronidasa acumulada bajo el mismo, por lo cual aquél, quedaría impotente ante el mencionado fenómeno de despolimerización o disolución del mucus ooforo que rodea al óvulo.

El origen de la concentración inicial de hialuronidasa que presenta el esperma en el momento de la eyaculación, parece radicar en múltiples células germinales (espermátidas, preespermáticas, espermatozoides) abortivas, quienes al ser destruídas liberarían mayor cantidad del

referido fermento y en función del grado de madurez alcanzado por ellas mismas. De otra parte, parece existir relación directa entre la elaboración del fermento por el epitelio germinal y la capacidad incretora del testículo, actuando como eslabón probable de tal fenómeno la vitamina C.

El incremento notable en el porcentaje de formas anormales, que se aprecian en la primera experiencia del trabajo reseñado al añadir hialuronidasa al esperma normal, así como la disminución en el tiempo de supervivencia espermática, confirma la significación de los espermatozoides sin capuchón cefálico (formas calvas) en el medio, y el mecanismo de su origen (por disolución de la stricia transversalis) o ligamento que fija periféricamene el capuchón cefálico al cuerpo de espermatozoide.

II

Conocida la acción in vitro de la hialuronidasa en relación con la morfología de los espermatozoides, nos faltaba por conocer el factor inhibidor o regulador de la puesta en marcha del mecanismo de despolimerización mesenquimal del fenómeno enzimático. que a su vez daría lugar a la desintegración zoospérmica.

PARROT y FUSQUELLA en 1949, descubren el efecto inhibidor que en general presenta la vitamina C frente a la hialuronidasa; esta demostración junto a las experiencias de BEILER y MARTIN (1946-48), en relación con el efecto de los jugos cítricos sobre la hialuronidasa, nos indujo a experimentar el posible efecto inhibidor de la vitamina C sobre la acción que el referido fermento presentaba sobre la integridad espermática.

Levada a cabo la mencionada experiencia (publicación citada) se llega a la conclusión de que la adición de vitamina C al esperma, sin prolongar ostensiblemente el tiempo de supervivencia de los espermatozoides, determina cierta reacción de hipercinesis en su comportamiento motor. Pero lo más interesante es la evidente reducción que se obtiene en el porcentaje de formas cefálicamente alteradas.

Este fenómeno de inhibición a la alteración estructural zoospérmica de la vitamina C, significa en principio, un comportamiento opuesto al de la hialuronidasa. Sin embargo en refuerzo de tal efecto inhibidor de la vitamina C sobre la hialuronidasa, tenemos los resultados deducidos en el ya mencionado trabajo, al añadir simultáneamente al esperma

los dos elementos (vitamina y fermento), obteniéndose efectos intermedios o nulos sobre los espermatozoides.

En nuestro trabajo de investigación titulado "La vitamina C en el esperma de toro y morueco" (Revista Veterinaria, septiembre de 1954), se demuestra la importancia de las concentraciones de ácido ascórbico en el esperma de toro y morueco, así como la relación de la referida concentración en vitamina C con la capacidad fecundante de los sementales, deducida del normal comportamiento de los espermatozoides ante los principales tests de control biológico. Nuestro punto de vista, es que la protección y aumento de la capacidad fecundante determinado por la presencia de la vitamina C en el esperma, radica en oponerse al efecto de envejecimiento precoz y languidez vital que en los espermatozoides determinaría la hialuronidasa a no ser inhibida.

La vitamina C, mientras el zoopermo se encuentra en el aparato genital masculino y especialmente a la altura del testículo y del epididimo, manifiesta su enérgica inhibición sobre la hialuronidasa, garantizando así la integridad de los zoopermas. En las ampollas de Henle, su efecto no parece tan propicio teniendo en cuenta el carácter vascular de estos órganos y en definitiva del pH orgánico.

La eyaculación significa en todo caso, la mixtificación de los espermatozoides con líquidos de diferente naturaleza y el exudado del aparato genital femenino de otra parte, cuyo efecto queda sumado a la aireación y ventilación del eyaculado aún, en los animales de fecundación interna. Todos estos factores contribuyen a la destrucción de la vitamina C, en unos casos, por oxidación y en otros, por neutralización (ácido ascórbico) quedando con escasas posibilidades de inhibición biológica sobre la hialuronidasa espermática; pero por si todo esto fuese poco, hay que tener en cuenta que la masa espermática no es inerte. Los espermatozoides se liberan del líquido (eyaculado) merced a sus propios movimientos progresivos, terminando por abandonarle totalmente para ambientarse en el medio genital femenino a diferentes alturas del tractus genital.

Finalmene los espermatozoides maduros, se ven libres del freno que inhibe la hialuronidasa (vitamina C), que por ello entra en función, disgrega las conexiones cefálicas y se libera ampliamente en el medio, perdiéndose el capuchón cefálico. Este fenómeno se establece totalmente, en ese lapsus de espera que de acuerdo con las modernas investigaciones de CHANG sufren los gametos alieados frente a frente, en situación tubárica (en general), a escasa distancia y casi inmóviles; irrumpiendo luego con especial hipercinesis hacia el óvulo para verificarse la verdadera conjugación gamética. El referido lapsus, transcurre entre una y diez horas de tiempo variable para cada especie animal.

Durante el lapsus gamético señalado, o el "capacitation of manmalian sperms de CHANG", la vitamina C no tendría ninguna participación, ya que la escasa concentración que haya podido resistir a los agentes destructores queda en todo caso, con el resto del líquido (eyaculado) en situación del tractus genital muy inferior en relación con la que han alcanzado los espermatozoides.

III

La experimentación a fin de analizar el efecto de la adicción de estrógenos al líquido espermático, queda en parte reflejada en la publicación "Investigación en torno al efecto del Dienestrol sobre la actividad y morfología de los espermatozoides" en los anales de la Facultad de Veterinaria de León (1956). La señalada investigación fué planteada en primer lugar, para demostrar hasta qué punto las hormonas feminizantes (estrógenos) tienen participación más allá de determinar o desencadenar lo que en otra publicación llamábamos primera y segunda conjugación, o sea, la conjugación sexual (atracción de sexos opuestos) y genital (cópula) respectivamente.

Las observaciones de *MIRSKAY* en estos últimos años, en cuanto a la notable capacidad de la vaca para quedar fecundada cuando se la insemina transcurrido no solo el acné del celo, sino su total sintomatología, han logrado modificar la opinión clásica de practicar la cópula o la inseminación en el acné del celo, por la interesante recomendación de llevarlas a cabo inmediatamente después de finalizar el referido período. Estas observaciones, parecían significar que efectivamente, el papel de los estrógenos elaborados durante el celo no llegaban más allá de conseguir la conjugación genital (cópula) favoreciendo y disponiendo a todos los órganos participantes en el señalado acto, para su perfecto funcionamiento. Así como determinar las correspondientes modificaciones orgánicas, genitales y extragenitales precisas, para establecerse la fase

maternal, que en condiciones de fecundación efectiva habría de suceder a la fase femenina o impregnación estrogénica.

De otra parte, es evidente, que los espermatozoides se desenvuelven en ambiente estrogénico cuando el eyaculado es situado en el aparato genital de la hembra en celo. Medir el valor de esta influencia, ha sido en parte objeto de la publicación anteriormente señalada y de cuyas conclusions sabemos que: la adición de Dinestrol al medio espermático, reduce la supervivencia de los zoospermas en 60-90 horas; limitando al mismo tiempo el número de formas morfológicamente alteradas.

De la referida experiencia se llega igualmente a la conclusión, de que la acción del Dinestrol determina en cuanto a la alteración estructural efectos totalmente opuestos a los conseguidos tras la adición de hialuronidasa. No obstane, es preciso tener en cuenta qeu las experiencias se hicieron únicamente con el 3-4 p.p. dihidroxidifenil-2-4 hexadieno, cuerpo sintético, que por sus condiciones de solubilidad en el agua, estado sólido, perfecta valoración y dosificación, gran actividad y escaso precio fué elegido para la mencionada experiencia.

IV

Parte experimental.—En la presente investigación que forma parte como señalábamos al comienzo del plan de experiencias en torno a la importancia de la participación de fermentos, vitaminas y hormonas en el fenómeno de la conjugación de los gametos, nos proponemos descubrir el mecanismo de la hipercinesis espermática determinada "in vitro" por el Dienestrol. Así como valorar la intensidad de la misma a través de los tests de uso más frecuente en control físico-químico del esperma.

Para llevar a cabo la señalada experimentación así planteada, hemos partido de esperma puro de toros normo-funcionales, al que se ha añadido dinestrol; en la idea de que en tales condiciones la supervivencia in vitro de los espermatozoides no supera en general las 72 horas. Apreciándose sin embargo, y con notable intensidad variaciones en la cinesis y normo-estructura que por trabajar con ausencia de menstruo artificial (esperma puro), resulta fácil valorar su presencia e intensidad.

1.° *Motilidad espermática.*

a) *Motilidad masiva e individual.*—Se ha experimentado con cincuenta muestras de esperma procedentes de diferentes toros normales.

A cuatro cc. de esperma puro, se añade 0,1 cc. de solución tampnizada (pH = 6,8) en la que s ha disuelto dinestrol a la concentración tal que a 0,1 cc. corresponden 500 U. I. de estrógeno, equivalentes a 0,05 miligramos de 3,4 p.p. dihidroxidifenil 2-4 hexadieno (dienestrol). Las muestras con sus correspondientes testigos han sido mantenidas en estufa termostato a 30 grados centígrados y bajo capa de parafina.

El esperma total procede de la mezcla del recolectado en dos eyaculados sucesivos, del que se han tomado 4 cc. más el necesario para los diferentes tubos testigos; en todo caso los toros estaban sometidos a régimen regular de recolección de esperma.

La motilidad masiva, se ha determinado mediante la técnica de Blom y sus valores fueron deducidos de acuerdo con el baremo del mismo autor. La motilidad individual, ha sido valorada por la técnica de gota aplanada, reflejando los resultados por el sistema de quintos.

Inmediatamente de la recogida de esperma se han verificado las pruebas de motilidad masiva, individual, reducta simetría, resistividad electrolítica y valoración de formas anormales. Posteriormente se han separado los testigos para apreciar comparativamente los efectos de la adición de dienestrol a las muestras problema.

El cuadro número 1, refleja las características y resultados obtenidos en cuanto a motilidad masiva. De la observación de la tabla resumen se deducen las siguientes variaciones cineto-espermáticas.

1.° Después de la primera hora de supervivencia in vitro, no se aprecian diferencias en cuanto al comportamiento motor en los tubos problema y testigo, coincidiendo en general las signaciones del Blom en ambos casos.

2.° Transcurridas cinco horas de supervivencia, se aprecia, que la motilidad se mantiene con mayor regularidad en los tubos problema (con dienestrol). El porcentaje de inactivación en los tubos testigos llega a alcanzar el 12 por ciento.

3.° Las observaciones practicadas a las 10 y 24 horas de la prueba, como la vitalidad se mantiene en los tubos problema y disminuye en los testigos, alcanzando porcentajes de inactivación del orden del 28 por ciento a las diez horas y del 66 por ciento en las observaciones hechas a las 24 horas.

4.° A las 36 horas de supervivencia in vitro, se acusa de una manera brusca notable disminución en la actividad cinética de los tubos problemas. Resultando, que mientras los testigos mantienen su actividad

con intensidad casi igual a la observada a las 24 horas, en los problemas se aprecia un descenso de la actividad que viene reflejado por el porcentaje de inactivación del 62 por ciento que aquéllos alcanzan.

5.° Las observaciones realizadas a las 60 horas del comienzo de la prueba, demuestran claramente cómo los tubos testigos conservan mejor actividad cinética; mientras que en los problemas apenas existe motilidad. El porcentaje de inactivación de las 48 horas es para los testigos del orden del 28 por ciento y para los problemas del 66 por ciento.

En la tabla número II quedan resumidas las observaciones realizadas en cuanto a motilidad individual de los espermatozoides por efecto de la presencia del dinestrol. La técnica seguida para las determinaciones ha sido la de WALTON mediante dilución previa del esperma al 1 : 1 con suero fisiológico (gota más gota) y de acuerdo con la tecnología anteriormente señalada. De la observación de la referida tabla se deduce:

1.° Se aprecia paralelismo entre la motilidad individual del esperma en los tubos problema y testigos, que prácticamente adquiere la misma intensidad hasta las diez horas del comienzo de la prueba en ambos casos.

2.° A partir de las diez horas de supervivencia, se observa, que la vitalidad se mantiene en los tubos problema, mientras los testigo presentan un porcentaje de casos en los que disminuye la actividad del orden aproximado del 62 por ciento.

3.° Lo mismo que en la tabla I, (motilidad masiva), se observa con relación a la motilidad individual, el mantenimiento de la actividad en los testigo resulta más regular. Apreciándose descenso en la motilidad de los testigo que afecta a las 24 horas del comienzo de la prueba al 26 por ciento de los tubos.

En general, se demuestra que a partir de las 24 horas, una marcada hipercinesis en los tubos problema que se acentúa sucesivamente mientras los testigo mantienen una actividad inferior. La motilidad individual de los utbos problema desciende bruscamente a las 48 horas y es prácticamene nula a las 60, mientras que los testigos conservan todavía una actividad cinética casi semejante a la que manifestaban a las 48 horas.

De la observación del cuadro número III, se deducen los siguientes comportamientos que vienen expresados por el porcentaje de valores comprendidos entre las cifras siguientes.

Motilidad Masiva

Tiempo transcurrido en h. de conservación

Tubos testigo y problema

Tabla nº I

	1 h.		5 h.		10 h.		24 h.		36 h.		48 h.		60 h.	
	T.	P.	T.	P.	T.	P.	T.	P.	T.	P.	T.	P.	T.	P.
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	+	+	−
2	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+++	+	++	+	+	+	−
3	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+	o
4	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+ +	+	+	+
5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+ +	+	+	+	+
6	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+ +	+	+ +	+	+	+	+
7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+	+	−
8	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+ +	+	+	−
9	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+ +	+	+	−
10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+ +	+	+	o
11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+	+	o
12	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+	+ +	+	+	−
13	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+ +	+	+	+	−	+	o
14	+++	+++	+ +	+++	+++	+++	+	+++	+	+ +	+	+	−	o
15	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+	−
16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+ +	+ +	+	+	−
17	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+	+++	+	+ +	+	+	+	−
18	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+	+++	+	+ +	+	+	+	−
19	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+	+	+
20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+	+	+	+
21	+++	+++	+ +	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+	+	+
22	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+	+	+
23	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+	+++	+	+++	+	+ +	+	−
24	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+	−
25	+ +	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+	+	+	−
26	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+	+	+	−
27	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+ +	+	+	+	−
28	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+	+++	+	+ +	+	−	+	o
29	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+	+	−
30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+	+	+	−
31	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+++	+++	+ +	+	+	+	+
32	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+ +	+	+ +	+	−	+	o
33	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+	+	+	−
34	+++	+++	+ +	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+	+	+	−
35	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+ +	+	+ +	+	o	o	o
36	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+	+++	+	+ +	+	+	−	o
37	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	−	o	o
38	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+	+	−	−
39	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+	+++	+	+ +	+	+	−	o
40	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+
41	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+	+	−
42	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+	+++	+	+ +	+	+	+	−
43	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+ +	+ +	+	−
44	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+	+	+	+
45	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+	+++	+	+ +	+	−	−
46	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+ +	+ +	+	+	+
47	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+	+++	+	+++	+	o	−
48	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+	+	+	o
49	+++	+++	+++	+++	+ +	+++	+	+++	+	+ +	+	+	+	−
50	+ ++	+++	+++	+++	+ +	+++	+ +	+++	+ +	+ +	+	−	+	o

Motilidad individual — Tabla nº II

Tiempo transcurrido, horas de supervivencia

Tubos	1h.		5h.		10h.		24h.		30h.		48h.		60h.	
	T.	P.	T.	P.	T.	P.	T.	P.	T.	P.	T.	P.	T.	P.
1	5	5	5	5	4	5	4	5	4	2	2	1	1	0
2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	2	1	1	1
3	4	5	5	5	3	5	3	4	3	4	3	2	0	0
4	5	5	5	5	4	5	4	5	4	4	2	2	1	0
5	5	5	5	5	4	5	4	5	4	4	3	2	1	0
6	5	5	5	5	3	5	3	5	3	2	3	2	1	1
7	5	5	5	5	4	5	3	5	3	3	3	1	2	1
8	5	5	5	5	5	5	4	5	4	3	3	1	2	0
9	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	3	2	1	0
10	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	3	0	1	0
11	5	5	5	5	4	5	4	5	4	2	3	1	2	1
12	5	5	5	5	3	5	3	5	3	3	3	2	2	0
13	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	4	1	1	0
14	5	5	5	5	3	5	3	5	3	3	2	1	1	0
15	5	5	5	5	4	5	4	5	4	5	3	1	1	0
16	5	5	5	5	4	5	4	5	4	5	4	2	1	1
17	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	1	1	1
18	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	3	1	1	0
19	5	5	5	4	5	4	5	4	5	2	4	0	2	1
20	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	2	2	2	0
21	5	5	4	5	4	5	4	5	4	4	1	0	1	0
22	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	2	2	1
23	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	2	1	2	0
24	5	5	5	5	4	5	4	5	3	4	2	0	2	0
25	5	5	5	5	4	5	4	5	2	3	1	2	1	0
26	4	4	4	4	3	4	3	4	3	4	1	1	1	0
27	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	1	1	1	0
28	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	0	1	0
29	5	5	5	5	5	5	3	5	2	3	1	0	1	0
30	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	2	3	1	0
31	5	5	5	5	5	5	4	5	3	4	2	1	0	0
32	5	5	5	5	4	5	4	5	3	4	3	2	1	0
33	5	5	5	5	3	5	3	5	3	5	3	0	1	0
34	5	5	4	5	3	5	3	5	2	4	2	0	1	0
35	5	5	4	5	4	5	4	5	3	4	3	1	1	1
36	5	5	5	4	5	4	5	5	4	3	2	0	0	0
37	5	5	5	5	3	5	3	5	2	3	2	1	1	0
38	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	2	2	1	1
39	5	5	5	5	5	5	5	5	3	2	1	0	1	0
40	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	1	0	1	0
41	5	5	5	5	3	5	3	5	4	5	3	2	1	1
42	5	5	5	5	4	5	4	5	3	4	3	3	1	1
43	5	5	5	5	4	5	4	5	2	3	2	0	1	0
44	5	5	5	5	4	5	3	5	3	4	3	0	1	0
45	5	5	5	5	4	5	3	5	3	4	3	0	1	0
46	4	4	4	4	4	4	4	5	4	4	2	2	1	0
47	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	3	0	0	0
48	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	3	0	0	0
49	5	5	5	5	3	5	3	5	3	2	3	0	1	0
50	4	4	4	4	4	4	3	4	2	3	2	1	1	0

Indice de Resistividad o Resistencia (R.) — Tabla nº III

	Tubos problemas (P.)	Tubos testigos (T.)
1	Valores — 3.500	Valores — 2.500
2	5.500	6.000
3	4.500	3.500
4	6.500	6.000
5	7.500	6.500
6	6.500	4.000
7	5.000	5.500
8	6.500	4.500
9	4.000	5.500
10	5.000	4.000
11	6.000	6.500
12	10.000	10.000
13	12.500	12.000
14	11.500	10.000
15	6.500	6.000
16	18.000	15.000
17	5.000	6.000
18	4.500	4.000
19	10.500	10.000
20	6.500	6.000
21	7.500	7.000
22	12.000	12.000
23	16.500	15.000
24	4.000	2.500
25	6.000	5.500
26	7.500	7.000
27	11.000	10.500
28	9.000	9.500
29	6.500	6.000
30	8.000	7.500
31	12.000	11.500
32	16.000	14.000
33	7.500	6.000
34	7.000	7.500
35	2.500	
36	4.000	4.500
37	3.000	2.500
38	2.500	2.000
39	850	900
40	11.000	10.500
41	16.000	15.500
42	2.500	2.000
43	9.000	8.500
44	6.000	6.000
45	8.500	8.000
46	650	700
47	1.500	2.000
48	4.000	3.500
49	1.000	500
50	6.500	6.000

Valores de tiempo de reductosimetria realizada a los 30' de recolección

Tabla IV

	Valores en tubos problemas (esperma + dienestrol)	Valores en tubos testigos (puro)
1		
2	8'5	9
3	10	12
4	6	6'5
5	7	7
6	9'5	8
7	7'5	7
8	6	10
9	7	9
10	8'5	8'5
11	9	11
12	9'5	8
13	6'5	7
14	8	9
15	10	10
16	8	8'5
17	6	7
18	10	10
19	12	11
20	13	16
21	9	10
22	11	18
23	7	7'5
24	8	9
25	9	11
26	6'5	7
27	8	9
28	5'5	7
29	6'5	9
30	10	12
31	6'5	7
32	8	8'5
33	6'5	6
34	7	7'5
35	11	15
36	10	11
37	7'5	9
38	7	9
39	5'5	14
40	9	10
41	7'5	9
42	7	7
43	9	10
44	7'5	8
45	6'5	7
46	7	8'5
47	8	9
48	7	8'5
49	9	15
50	10	12

Porcentaje de resistividad comprendidos entre los valores siguientes:

Tubos problema		Tubos testigo
3000 - 4000	= en 84 % tubos P.	80 % en tubos P.
3000 - 4000	= en 84 % tubos P.	80 % en tubos T.
5000 - 6000	= en 62 % tubos P.	66 % en tubos T.
6000 - 7000	= en 56 % tubos P.	42 % en tubos T.
7000 - 8000	= en 40 % tubos P.	34 % en tubos T.
8000 - 9000	= en 30 % tubos P.	28 % en tubos T.
9000 - 10000	= en 24 % tubos P.	26 % en tubos T.
10000	= 24 % tubos P.	18 % en tubos T.

En general, se aprecia un ligero aumento en los valores de resistividad (R) en los tubos que contienen esperma más dienestrol (P.). Parécese por tanto, que el dienestrol aumenta ligeramente la resistencia de los espermatozoides al efecto lesivo de los electrolitos (índice de resistividad).

C) *Comportamiento observado frente al test de reducta simetría de los espermatozoides en presencia de dienestrol el test* de reductasimetría (tiempo de reducción) frente al azul de metileno, se ha verificado de acuerdo con la técnica de Soreenssen modificado por Salisbury. Tomando 0,2 cc. de esperma más 0,8 cc. de diluyente citrato-yema de huevo, a cuya mezcla se añaden 0,1 cc. de solución de azul de metileno especial. A continuación, bajo capa de parafina se llevan los tubos al bañomaría a 44 grados centígrados.

Las determinaciones se hicieron en todos los casos a los 30 minutos de la recogida de esperma y la adición de dienestrol a los tubos problemas se hizo inmediatamente después de la recogida (de acuerdo con las normas señaladas al principio de esta experiencia).

En la tabla número IV pueden apreciarse los valores obtenidos en tiempo de reducción (índice de reductasimetría).

De la observación de la referida tabla número IV, se llega a la conclusión, de que el tiempo de reducción es menor en los problema que en los testigo (sin estrógeno). El porcentaje de valores problema menores que los correspondiente testigo, alcanzan el 78 por ciento de las observaciones, y el mismo valor en el 8 por ciento. Esta deducción demuestra, que el dienestrol adicionado disminuye el tiempo de reducción, probablemente pora celerar los procesos metabólicos de tipo ener-

gético en los espermatozoides y con ello el efecto reductor sobre el azul de metileno.

Discusión.—La adición de dienestrol al medio espermático proporciona hipercinesis en los espermatozoides, al mismo tiempo que disminuye el tiempo de supervivencia. Este fenómeno, puede explicarse admitiendo el efecto espermiodinámico del dienestrol a través de aumentar el consumo energético (estímulo metabólico); disminuyendo de este modo la reserva energética de los espermatozoides que termina agotándose y dando lugar al desfallecimiento prematuro de los zoospermos conservados in vitro. En apoyo de esta hipótesis, tenemos la reducción que se observa en el esperma tras la adición de dienestrol y frente al test biológico de reductasimetría.

Los incrementos cinéticos conseguidos por el referido agente químico en relación con los tests de "motilidad masiva e individual" sería la consecuencia del aumento en la actividad general de los espermatozoides. El resultado que reflejan las observaciones frente a los citados tests demuestran, que la hipercinesis zoospérmica es obra fundamental de haberse estimulado la motilidad progresiva.

A fin de evitar las posibles influencias que las variaciones de temperatura pueden determinar sobre la motilidad espermática, las señaladas valoraciones de la actividad cinética del esperma, fueron hechas a la temperatura de 30 grados centígrados sostenida mediante la cámara termoestática adaptada al microscopio.

La mayor resistencia (índice de receptividad-R.), observada en las muestras de esperma tras la adición de dienestrol, parece radicar en un esfuerzo de la resistencia estructural de los espermatozoides. Precisamente la señalada experiencia se comenzó a las 15 horas de la recogida y de la adición del estrógeno, por haber observado que los índices de receptividad, resultan más regulares después de algún tiempo de recolectado el esperma y de otra parte, a fin de dar tiempo al efecto del dienestrol sobre los espermatozoides problema.

CONCLUSIONES

I) La adición de 500 U. I. de 3-4 p.p. dihidroxidifenil 2-4 hexadieno a 4 cc. de esperma de toro normal, determina incremento notable en la cinesis de los espermatozoides. Reflejando su máxima intensidad

para los tests de motilidad masiva de 10 a 30 horas de conservación in vitro y a temperatura de 30 grados centígrados. Observándose que a partir de las 36 horas y más claramente a las 48 decrece bruscamente la actividad motora, que por el contrario se mantiene con mejor tono en los espermatozoides no sometidos al efecto del dienestrol (tubos testigo).

II) El efecto del dienestrol sobre la motilidad individual de los espermatozoides, resulta de franca hipercinesis, que en general, se manifiesta a las 24 horas del comienzo de la prueba, se mantiente hasta las 48 y decrece a partir de este momento, para quedar reducida a actividad casi nula a las 60 horas. En los testigos, la motilidad individual decrece lentamente y presenta valores superiores a los del esperma problema a las 60 horas del comienzo de la prueba.

III) El índice de receptividad (R.) de los espermatozoides experimentados de acuerdo con el tests de MILOVANOV, se encuentra ligeramente aumentado. Apreciándose valores superiores en los tubos problema (esperma más dienestrol) a los hallados en el esperma puro del orden de 8 : 2.

IV) El índice de reductasimetría, resulta inferior por efecto de la adición de dienestrol al esperma. El porcentaje de muestras problema en las que los valores fueron inferiores a los correspondientes testigos, resulta del orden del 78 por ciento.

V) Queda plenamente demostrado el efecto activo espermiodinámico del 3-4 p.p. dihidroxidifenil 2-4 hexadieno (dienestrol) añadido al esperma en las condiciones anteriormente señaladas.

El mecanismo del señalado efecto motor radica en la puesta en juego de la reserva energética acumulada en el espermatozoide, acelerando su metabolismo y exaltando la actividad cinética en beneficio de un mayor rendimiento inmediato (mayor capacidad fecundante), pero reduciendo las posibilidades de supervivencia o vitalidad in vitro.

BIBLIOGRAFIA

AUSTIN, C. R. 1948.—Nature. Che. Abstr. Vol. 42.

CHANG, M. C. 1947.—Proc. Soc. exr. Biol. Med. 66. 51-54.

BERHAMINI, L. 1949.—Chem. Abstr. Vol. 43.

CHANG, M. C. 1953.—Ann. N. Y. Acad. Sci. 1182-95.

FAVILLI, G., BOLL. 1940.—*Inst Sierotherapie.* Milán. 19. 481-500.

DURAN-REYNALS, F. 1950.—Ann. N. Y. Acad. Sci. 52. 496-57.

FAVILLI, G. 1947.—Boll. Soc. Med. Moderna. 47. 15.

GUERRA, F. 1946.—*Science* (New York). 686-87.

HAKANSON, E. Y., GLIK, D. 1949.—Clin. Inves. 28.

HAAS, E., BIOL, J. 1946.—*Chemistry*, 163, 63.

SEIFTER, J. 1950.—Ann. N. Y. Acad. Sci. 52, 1141.

WARREN, G. H. 1950.—*Science.* (New York), 111, 473-474.

PHILLIPS, R. W., ZELLER, J. H. 1941.—*Some factors affecting fertility in swinw.* Am. J. Vet. Res. Vol. 2, 5.

MIKHAGLOV, N. N. 1949.—*Milk as a semen diluent.* Vet. Bull. Vol. 21, núm. 2.

BONADONNA, T. 1952.—*Il material seminale, Collano tecnico feientifica.* Le Spalanzani, núm. 7.

FIORENTINO, A. 1953.—*Unteriore richerche sulla diluzione del Materiale Spermatico con latte serenato tuorlo d'novo ed antibiotic.* Atti. S. Dt. della Sc. Vet. VII.

CURTO, J. A. 1953.—*Del'influenza di Talune vitamine et ormoni sulla conservation della vitamita del nemaspermi di Bos-taurus.* Atti. S. It. della Sec. Vet. Vol. VII.

BLOM, E. 1950.—*The evaluotion of bull semen with special reference of eit emplo y ment for Artificial Insmination.* Amer. Fur. Breder. Vol. 17.

CHADDACH, T. T. 1950.—*Proper technique and value, of sperm chekking.* Amer. Fur. Breder. Vol. 23.

GOLGE, E. 1956.—*Tecniques for Artificial Insemination in Pigs. A. Q. e. Unit of reproduction Physiologi and Biochesmistry Animal Research et Station.* Hemitig and Roal. 20-27-1. Cambrigde.

HAARDIS, DAYRYMAN. 1950.—*A new semen diulter milk.* Vet. Bull. Núm. 19.

JAECQUE, J. 1951.—*Richerches sur quelques milieux biologiques de conservatio du sperme de tauraeau.* Bull. Acad. Vet. Vol. 24. 8.

FIORENTINO, A. 1954.—*L'émploi du lait e'creme dans la dilution du sperme de taureau.* The II. International Congress of Phy and Pathol. Of. Ann. Rep.

HAENDENSON, J. A.; MAEPHERSON, J. W. 1956.—*The use of semen in Tontine insemination of catle. III International Congress on animal Reproduction.* Cambridge.

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.

REPOSI, S., OLGATI, L.—*Assernaliccionl sull'attivita Fruttolitica ni vitro del menospermi de testicolo e delle ampolle semi nifere di Bostauru.* Atti. S. It. della Sc. Vet. Vol. VII.

EDWARDS. 1938.—*Artificial Insemination.* Mad. Univ. W.

HERMANN. 1956.—*Artificial Insemination.* Univ. Moss.

ROBERT. 1956.—*Veterinary Obstetries.* Cornell. Univ.

DXOG, A. W. 1953.—*Astudyes of semen production.* Univ. Minessotta.

HANEOCH, Y. L. 1951.—*A staininnding tecniches for the study of semen.* Cambridge.

PEREZ y PEREZ, F. 1955.—*Hialuronidasa y vitamina C.* Anales Facultad de Veterinaria de León.

PEREZ y PEREZ, F. 1956.—*Investigaciones en torno al efecto del dinestrol sobre la vitalidad y morfología del espermatozoide.*

PEREZ y PEREZ, F. 1954.—*Investigaciones sobre el efecto del shock térmico experimental en el esperma de morueco y garañón.* Ciencia Veterinaria, núm. 112.

PEREZ y PEREZ, F. 1954.—*La vitamina C en el esperma de toro y morueco.* Veterinaria, setiembre.