

## Investigaciones cromocitológicas y citomorfológicas en el espermatozoide de Guraña en relación con el grado de maduración de los espermatozoides

*Prof. Dr. Félix Pérez Pérez*

Las investigaciones cromocitológicas y citomorfológicas de la célula espermática resultan de gran importancia por sus posibilidades de aplicación práctica en la contrastación del espermatozoide. Dentro de la contrastación microscópica, tiene especial interés la valoración en los zoospermos de las distintas fases del "ciclo cefálico".

FUMAGALLI, en 1942, demostró que los espermatozoides del toro, al poco tiempo de desambarazarse de las células de SERTOLY, eran en su mayoría ostensiblemente más pequeños que los espermatozoides ya maduros existentes en el eyaculado, apreciando en aquéllos un especial comportamiento frente a la tinción por el método de Gram. En tal sentido, los espermatozoides procedentes de los tubos seminíferos resultaban en su mayoría "gram negativos", apareciendo más tarde unos corpúsculos acidófilos y por tanto de carácter gram positivo, que resaltaban claramente sobre el resto de la cabeza zoospermica, que se presenta homogéneamente gram negativa.



A medida que avanza el proceso de maduración de las referidas células, en los distintos tractus del aparato genital van apareciendo granulaciones gram positivas en la cabeza (al principio finas y después más amplias), que comenzando por la extremidad distal de aquélla, van invadiendo a la totalidad de la célula, que termina siendo toda ella homogéneamente gram positiva, pasando por las fases de: "parcialmente granulosa y totalmente granulosa". A estos particulares comportamientos cromocíticos de las cabezas en los espermatozoides de toro, fueron designados por BONADONNA con el nombre de "ciclocefálico".

La significación de este hecho, no es otra que responder a una disposición especial y propiedades químicas de los núcleo-proteídos, principalmente, que integran el contenido cefálico del espermatozoide. Se ha pretendido explicar este fenómeno de variaciones de tinción, mediante las teorías de KRUE, FISCHER, EISEMBRI, HOTTINGER, etc.; se admite con HOTTINGER que tanto en los gérmenes gram negativos como en los espermatozoides de este mismo comportamiento, los núcleo-proteídos se encontrarían en fase de coloide disperso, mientras que en los gram positivos lo estarían agrupados formando núcleos o corpúsculos más o menos grandes, hecho, relacionado además a razones de cambios en su carga eléctrica. De este modo quedaría explicada la formación de las imágenes: "espermatozoides gram negativos con periferia gram positiva, parcialmente granulosa, y los totalmente granulosa".

FUMAGALLI ha demostrado la relación existente entre la capacidad fecundante de una muestra de esperma fresco y el carácter de "gram positividad" de los zoospermos en el contenido; presentándose después, esto es, durante la conservación in-vitro del esperma un fenómeno reversible con relación al primero o de maduración que conduce a la destrucción de la célula espermática.

BONADONNA, FUMAGALLI y MASSIRONI han descubierto en los espermatozoides procedentes del testículo de toro un 69,5% de espermatozoides gram negativos y solamente un 2,5% de gram positivos, siendo los restantes más o menos granulosa. En la cabeza del epidídimo señalan los referidos autores cifras del 50 % para los gram positivos y el 9 % de gram negativos, mientras que en la cola quedarían estas cifras reducidas al 1,8 % y el 59,1 %, respectivamente.

En el trabajo publicado en colaboración con nuestro maestro en los *Anales de la Facultad de Veterinaria de Madrid* (1950), "El método de Gram —safranina en la maduración de los espermatozoides de morueco—", demostramos un comportamiento

semejante en el curso de la maduración de la referida especie, con los siguientes resultados:

|                          | <i>G. negativos</i> | <i>P. g.</i> | <i>T. g.</i> | <i>G. positivos</i> |
|--------------------------|---------------------|--------------|--------------|---------------------|
| Testículo .....          | 60,0 %              | 14,70 %      | 18,5 %       | 7,0 %               |
| Cabeza epidídimo.....    | 44,0 %              | 15,70 %      | 18,0 %       | 7,5 %               |
| Cola epidídimo.....      | 3,5 %               | 13,40 %      | 50,7 %       | 32,3 %              |
| Ampollas deferentes..... | 3,2 %               | 4,47 %       | 48,0 %       | 38,8 %              |
| Eyaculado.....           | —                   | —            | —            | 98 %                |

Consideramos interesante precisar en otras especies animales semejante comportamiento cromocitológico en la maduración espermática, a fin de poder valorar a través de aquellas observaciones la calidad del material seminal, y hasta sacar conclusiones respecto a las posibilidades fecundantes de los seminales, regular su actividad sexual, etc. Para lo cual habremos de tener muy en cuenta, en primer lugar, el porcentaje de cada una de las variedades de espermatozoides apuntadas en el eyaculado, testículo, epidídimo, etc., a fin de saber si aquellas formas oscilan entre límites normales o nos encontramos frente a la anormalidad.

En el presente trabajo intentamos resolver dos aspectos fundamentales de la contrastación microscópica del esperma en sus aspectos de valoración: cromocitológica y citomorfológica.

## I

### INVESTIGACIONES SOBRE EL COMPORTAMIENTO CROMOCITOLOGICO DE LOS ESPERMATOZOIDES DE GARAÑON EN PREPARACIONES TENIDAS CON EL METODO DE FUMAGALLI

**Primera experiencia.**—Trabajamos con esperma procedente de 10 garañones; de cada uno de ellos hicimos varios frotis, que teñimos por el método de Gram modificado por FUMAGALLI. Los frotis fueron hechos inmediatamente después de la recogida siendo todos los seminales normales en cuanto a cantidad, calidad, capacidad fecundante y régimen sexual a que se encontraban sometidos (véase cuadro núm. 1.)

**Finalidad.**—No es otra, sino la de demostrar, en primer lugar, la existencia de formas gram positivas en el eyaculado, así como señalar el porcentaje normal entre el que oscilan aquéllas:

**Conclusiones.**—De esta primera experiencia se llega a la conclusión general de que en el eyaculado normal de garañón



sometido a régimen de una eyaculación diaria o de eyaculación alterna, el número de espermatozoides gram positivos en los frotis fijados y teñidos por la técnica de FUMAGALLI aparecen en el espermiograma con variaciones que oscilan entre 98 %, y 96 % respectivamente.

**Segunda experiencia.**—Tiene por finalidad demostrar en los espermiogramas procedentes de testículo, epidídimo (cabeza-cola), ampollas deferentes y material del eyaculado normal, las distintas variedades de espermatozoides, de acuerdo con sus propiedades de tinción ante el método de FUMAGALLI.

Trabajamos con cinco garañones, tres procedentes del matadero y dos del material de la Clínica Quirúrgica (Castración). Mediante la técnica descrita en nuestro trabajo, anteriormente citada, obtuvimos esperma de cada uno de los órganos señalados; solamente en tres casos pudimos hacer preparaciones con material de los testículos, epidídimo y ampollas de HENLE (previo sacrificio).

De estos cinco garañones objeto de nuestro estudio, tres de ellos eran de edad comprendida entre tres y cuatro años, en uno de los cuales (núm. 3) habíamos realizado previamente recogida de material seminal mediante la vagina artificial. Los restantes eran animales de 7, 14 y 16 años, respectivamente, llevados al matadero por circunstancias diversas.

Los resultados, en cuanto a las formas encontradas en las distintas preparaciones correspondientes al material de los órganos en estudio, queda sintetizado en los cuadros II, III y IV, respectivamente.

**Tercera experiencia.**—Va encaminada a demostrar la influencia de la reiteración del coito en la cantidad de espermatozoides gram positivos existentes en el eyaculado. Para ello, aparte de los resultados obtenidos en el cuadro anterior (garañón núm. 10), hemos podido trabajar al efecto con los sementales núms. 3 y 4, correspondientes al cuadro I.

En estos sementales (propiedad del Servicio de Inseminación Artificial Ganadera) hemos practicado hasta tres recogidas diarias en cada uno, con el siguiente cuadro cromocitológico en cada uno de los animales.

CUADRO núm. 5

| Garañón<br>núm. 1        | Intervalo entre<br>cada recogida | Porcentaje de cada variedad de espermatozoides por |       |       |          |
|--------------------------|----------------------------------|--|-------|-------|----------|
|                          |                                  | G. posit.  | P. G. | T. G. | G. negt. |
| 1. <sup>a</sup> recogida | 24 horas                         | 98   | —     | —     | 2        |
| 2. <sup>a</sup> recogida | 6 horas                          | 90   | 2     | 2     | 6        |
| 3. <sup>a</sup> recogida | 30 minutos                       | 83   | 5     | 6     | 6        |

CUADRO núm. 6

| Garañón<br>núm. 2        | Intervalo entre<br>cada recogida | Porcentaje de cada variedad de espermatozoides por |       |       |          |
|--------------------------|----------------------------------|--|-------|-------|----------|
|                          |                                  | G. posit.  | G. P. | T. G. | G. negt. |
| 1. <sup>a</sup> recogida | 48 horas                         | 97   | —     | 1     | 2        |
| 2. <sup>a</sup> recogida | 84 horas                         | 95   | —     | 3     | 2        |
| 3. <sup>a</sup> recogida | 15 minutos                       | 87   | 2     | 4     | 7        |

A las 24 horas de la tercera recogida a estos sementales se les volvió a recoger, encontrando en las preparaciones respectivas los siguientes cuadros cromocitológicos:

CUADRO núm. 7

|                | G. Posit. | P. G. | T. G. | G. negt. |
|----------------|-----------|-------|-------|----------|
| Garañón núm. 2 | 97        | 2     | 1     | 1        |
| Garañón núm. 1 | 98        | —     | 1     | 1        |

A las 48 horas de esta experiencia (período de descanso), conseguimos hacer otras tres recogidas a cada semental (una en la mañana y dos en la tarde), con los siguientes resultados:

CUADRO núm. 8

|                          |          | <i>G. posit.</i> | <i>G. P.</i> | <i>T. G.</i> | <i>G. negt.</i> |
|--------------------------|----------|------------------|--------------|--------------|-----------------|
| 1. <sup>a</sup> recogida | 48 horas | 98               | —            | 1            | 1               |
| 2. <sup>a</sup> recogida | 6 horas  | 94               | 3            | 1            | 2               |
| 3. <sup>a</sup> recogida | 1 hora   | 82               | 6            | 4            | 8               |

CUADRO núm. 9

| Garañón<br>núm. 2        | Intervalo entre<br>cada recogida | Porcentaje de cada variedad de espermatozoides por |       |       |          |
|--------------------------|----------------------------------|--|-------|-------|----------|
|                          |                                  | G. posit.  | P. G. | T. G. | G. negt. |
| 1. <sup>a</sup> recogida | 48 horas                         | 97   | —     | 2     | 1        |
| 2. <sup>a</sup> recogida | 6 horas                          | 95   | 1     | 2     | 2        |
| 3. <sup>a</sup> recogida | 30 minutos                       | 85   | 4     | 4     | 7        |

**Conclusiones.**—De los resultados de las experiencias segunda y tercera, se llega a las conclusiones siguientes:

1.<sup>a</sup> Lo mismo que en otras especies animales, en la asnal



tiene lugar, en el curso de la madurez de los espermatozoides, la imagen "ciclocefálica", en virtud de la cual los zoospermos van pasando de gram negativos a gram positivos, es decir, de la basiofilia a la acidofilia, a través de formas de transición (gram negativos, con periferia gram positiva, parcialmente granulosa y totalmente granulosa). Siendo interesante destacar que entre el paso de espermatozoides gram negativos a granulosa, existe en estas especies, con la frecuencia que se reseña en el cuadro número 2, las formas gram negativas con periferia gram positivas.

2.ª En el testículo (tubos seminíferos) aparece el siguiente cuadro cromocitológico:

|  |        |
|--|--------|
| Espermatozoides gram negativos ... ..  | 49,6 % |
| Esp. de periferia gram positiva ... .. | 7,6 %  |
| Esp. parcialmente granulosa ... ..     | 13,6 % |
| Esp. totalmente granulosa ... ..       | 26,4 % |
| Esp. gram positivos ... ..             | 6,6 %  |

En los demás órganos: epididimo, conductos deferentes, etc., los espermatozoides gram negativos, son al menos periféricamente gram positivos al perdurar la película acidofila de que se recubren al parecer en el propio testículo.

3.ª El cuadro normal cromocitológico de epididimo en la referida especie encontrado por nosotros en los animales contrastados, es el siguiente:

| Cabeza del epididimo |        | Cola del epididimo |        |
|----------------------|--------|--------------------|--------|
| g. negativos ... ..  | 41 %   | ... ..             | 6,8 %  |
| p. granulosa ... ..  | 16,4 % | ... ..             | 7,4 %  |
| t. granulosa ... ..  | 26,4 % | ... ..             | 11,4 % |
| g. positivos ... ..  | 17,8 % | ... ..             | 75,8 % |

4.ª El cuadro cromocitológico de las ampollas deferentes corresponde a los siguientes valores:

|                     |        |
|---------------------|--------|
| g. negativos ... .. | 2,3 %  |
| p. granulosa ... .. | 3,6 %  |
| t. granulosa ... .. | 9,6 %  |
| g. positivos ... .. | 84,3 % |

5.ª Cuanto más intensa es la actividad sexual de los seminales, más bajos resultan los porcentajes de espermatozoides gram positivos encontrados en el eyaculado. En los eyaculados verificados con intervalos de seis a ocho horas el porcentaje de los espermatozoides gram positivos, disminuye hasta un 4 %.

En el tercer eyaculado ocurrido dentro de las veinticuatro horas y con intervalos entre éste y el segundo eyaculado de 15 a 60 minutos, los espermatozoides gram positivos decrecen hasta en un 12 %.

6.ª La recuperación del porcentaje de formas gram positivas en el eyaculado, tuvo lugar en todos los casos examinados a las cuarenta y ocho horas de verificada la última recogida.

7.ª La disminución en los eyaculados de las formas gram positivas, va acompañada de un aumento en el número de espermatozoides "granulosa" y gram negativos.

## I I

El segundo aspecto de este trabajo es hacer el estudio morfo-citológico de los espermatozoides del garrón, en lo que se refiere al tamaño de la cabeza (longitud-anchura), a fin de precisar las posibles relaciones entre el desarrollo de aquella y el grado de maduración relacionado con las distintas fases del "ciclo cefálico" de BONADONNA, puesto de manifiesto en las experiencias anteriores.

Esta experiencia la hemos dividido en los siguientes grupos:

a) Determinación de las cifras medias correspondientes a la longitud y anchura de la cabeza en los zoospermos gram positivos procedentes del eyaculado normal; no con el fin de descubrir las dimensiones normales correspondientes a este tipo de espermatozoides, ya demostradas por MOITTI, DAVINO, MASSIRONI y más modernamente (1953) por BRETSCHNEIDER, sino más bien para determinar límites de variación mediante la aplicación de la misma técnica, que nos habrá de servir más tarde para la determinación de aquellas dimensiones en las demás variedades cromocitológicas del esperma.

b) Determinación de los valores anteriormente indicados en preparaciones hechas con material seminal procedente de los tubos seminíferos y de carácter gram positivo frente al método de tinción de FUMAGALLI.

c) Determinación de los valores correspondientes a la variedad de espermatozoides gram negativos en material procedente también de los tubos seminíferos.

d) Valores medios y variaciones de las dimensiones cefálicas correspondientes a la variedad "granulosa de material seminal procedente del testículo".

La medida del tamaño de los espermatozoides fué uno de los aspectos que antes preocupó a los históricos. LEEUWENHOCK, hacia el año 1650, realizó por primera vez estas pruebas en el espermatozoide humano. En la especie animal son muchos los investigadores que se han preocupado de tan interesante problema:



POPA y MARZA, REDENS MOITTI, MASSIRONI, DAVINO y BRETSCHNEIDER (al microscopio electrónico), etc.

La medida de los espermatozoides suscita verdadero interés, desde que ZIENEY y FAMT (1915), en su trabajo sobre la Biometría de la variabilidad espermática apuntaron el hecho más tarde comprobado en la especie bovina por FUMAGALLI, de que en el curso de la maduración, los zoospermos sufren variaciones importantes en su tamaño y muy especialmente en lo que se refiere al desarrollo de la cabeza.

La determinación de los diámetros medios (en longitud y anchura), coeficiente de variabilidad, desviación típica, etc., constituyen datos fundamentales para una posible técnica de control microscópico del esperma, que nos habría de servir no sólo para apreciar el porcentaje de formas anormales en un eyaculado, sino también el grado de maduración de los espermatozoides.

Lo mismo que en la medición de otras células, en la del espermatozoide se nos planteó el problema de llevarlo a cabo en preparaciones secas o en las húmedas. Es posible que en el curso del secado y fijación de las preparaciones los espermatozoides puedan perder la cantidad de agua suficiente para llegar a significar una disminución en sus diámetros que se acerque al 10% como se ha demostrado en otros tipos de células.

Hay que tener en cuenta, que además de que esta idea no es totalmente admitida por todos los histólogos (SCHURMELLER, WIECHMAN, etc), en el caso particular de los espermatozoides por razones de su particular estructura y composición química, aquélla resulta menos admisible. En todo caso, debemos tener muy en cuenta que las variaciones entre los resultados de una y otra técnica serían tan regulares que en caso de emplear preparaciones teñidas, nos proporcionarían siempre datos los suficientemente interesantes para el fin perseguido, ya que lo particularmente interesante del problema que nos ocupa son los valores comparativos en los demás espermatozoides.

Por otra parte, es casi axiomático en Histología "que cuando los valores de los diámetros celulares se alteran, las proporciones de aquella alteración tienen carácter cuantitativo para las demás células". Otro aspecto importante del presente trabajo, ha sido el tener que decidir entre los métodos de medición celular, directos e indirectos.

Los métodos de medición basados en el fenómeno físico de la "difracción" y su empleo en Histología, datan de hace bastantes años. (GRIMALDI, siglo XVII), culminando con la construcción años más tarde de un aparato para medir células de bastante exactitud por YUNG. En 1919, PIJPRE construye un aparato

cuyo fundamento en esencia radica en la composición corpuscular de la luz (teoría de NEWTON).

No faltaran histólogos que achacan a estos métodos graves errores, sobre todo cuando se aplican a la medición de determinadas células (FRESNEL y YUNG) al considerar que aquéllas pueden desvirtuar las imágenes al actuar en función de lentes.

El procedimiento más simple para medir células, es el de ocular micrométrico, que, como es sabido, requiere la perfecta contrastación con el objetivo y una constante atención y rigurosidad por parte del investigador. "La mayor parte de los errores en estos métodos que precisan más del investigador que de los aparatos, depende en frase de SCHALM del propio investigador.

Teniendo en cuenta que en las mediciones de las distintas variedades cromocitológicas de los espermatozoides recaen sobre variedades que para su identificación precisan una observación directa (apreciación de las formas gram negativas, etc.), no hemos hecho uso de los métodos de medición mediante proyecciones de las imágenes sobre pantallas (método de PRICE-YUNG), o sobre el papel fotográfico (método de FAXEN) y del sistema de fotomicrografías de SCHULTEN, que de no haber sido hechas con colores en nuestro caso particular, no nos hubieran sido útiles, salvo el caso de haber empleado en las células.

Después de haber contrastado los resultados del método "del ocular micrométrico" con los obtenidos por la técnica de PRICE-YUNG de algunas variedades de aquéllos y ante la escasísima variación, continuamos con el primer método aplicado en todas las variedades de espermatozoides al método de Gram.

La fijación de las preparaciones la hicimos mediante secado rápido al aire y fijación con alcohol metílico, siguiendo a continuación en todos los casos la técnica de Gram - FUMAGALLI, menos en la tinción de aquellas preparaciones en las que se trataba de medir espermatozoides gram negativos, en las cuales se empleó como colorante de fondo a fin de apreciar mejor su contorno la safranina.

El número de espermatozoides contado fué de 100 en cada una de las observaciones número, sino exageradamente elevado, sí al menos los suficientes para establecer resultados concluyentes. De otra parte el medir un número más elevado de células nos hubiera obligado a elegir otra técnica menos trabajosa, con los inconvenientes anteriormente apuntados.

Obtenidas las relaciones de cada uno de los valores reducidos a micras correspondientes a las longitudes y anchuras, se ha procedido en cada caso a la ordenación de los mismos para constituir las diferentes clases, separadas por su intervalo de 0,5 micras, que es la fracción de medida a la que creemos haber podido llegar mediante este método sin grave error. A continuación ano-



tamos el número de variantes correspondientes a cada clase (frecuencias), para constituir la "tabla de frecuencias" que luego representamos gráficamente (diagrama en columnas), a fin de observar más directamente la distribución de las mismas.

En segundo término, nos hemos ocupado dentro de cada problema biométrico del estudio de los "promedios", así como la determinación y representación gráfica del "modo y medida aritmética".

En tercer lugar se ha hecho el estudio biométrico de la variabilidad; en primer término, se ha determinado el grado de dispersión, a fin de darnos cuenta del ritmo de variabilidad de los caracteres en estudio, para lo cual se ha determinado la "desviación media" y la "desviación típica". Por otra parte creemos necesario comparar el grado de variabilidad, para lo cual hemos obtenido el "coeficiente de variabilidad".

Primera experiencia.—Determinación de los valores correspondientes a las longitudes y anchuras en las cabezas de los zoospermas gram positivos procedentes de eyaculado normal y teñidos con el método de Gram-FUMAGALLI.

a) Valores y constantes biométricas correspondientes a la longitud de la cabeza en micras de espermatozoides gram positivos, procedentes de eyaculado normal.

| Clases | Frecuencias (f) | Desviación (d) | f d  | f d <sup>2</sup> |
|--------|-----------------|----------------|------|------------------|
| 5      | 5               | — 4            | — 20 | 80               |
| 5,5    | 10              | — 3            | — 30 | 90               |
| 6      | 13              | — 2            | — 26 | 52               |
| 6,5    | 14              | — 1            | — 14 | 14               |
|        |                 |                | — 90 |                  |
| A=7    | 17              | 0              | 0    | 0                |
| 7,5    | 15              | 1              | 15   | 15               |
| 8      | 13              | 2              | 26   | 52               |
| 8,5    | 7               | 3              | 21   | 63               |
| 9      | 6               | 4              | 24   | 96               |
|        | 100             |                | 86   | 462              |

$$f \times d = 98 - 90 = -1$$

$$f \times d^2 = 462$$

Medida aritmética

$$\bar{m} = A + E \lambda_c = 7 + (-0.0105) = 7 - 0.005 = 6.995$$

Error probable de la media

$$\sigma_m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = \pm \frac{1.07}{\sqrt{100}} = \pm \frac{1.07}{10} = \pm 0.107$$

Desviación típica

$$\sigma = \left( \pm \sqrt{\frac{\sum f d^2}{N}} \right) \lambda_c = \left( \pm \sqrt{\frac{462}{100}} - 0.0001 \right) 0.5 = \pm 2.1405 = \pm 1.07$$

Error probable de la desviación típica

$$\sigma_s = \frac{\sigma}{\sqrt{2N}} = \pm \frac{1.07}{\sqrt{200}} = \pm \frac{1.07}{14.14} = \pm 0.075$$

Coefficiente de variabilidad

$$v = \frac{\sigma \times 100}{\bar{m}} = \frac{1.07 \times 100}{6.995} = \frac{1.07}{6.995} = 15.29\%$$

Error probable del coeficiente de variabilidad

$$\sigma_v = \pm v \sqrt{\frac{1 + 2 \left( \frac{100}{v} \right)^2}{2N}} = \pm 15.29 \sqrt{\frac{1 + 2 \left( \frac{100}{15.29} \right)^2}{2 \times 100}} = \pm 15.29 \times 0.657 = \pm 10.0455$$

b) Medidas y constantes biométricas correspondientes a la anchura de los espermatozoides objeto de esta experiencia, tomada en la parte media de la longitud de la misma.

| Clases | Frecuencias (f) | Desviación (d) | f d  | f d <sup>2</sup> |
|--------|-----------------|----------------|------|------------------|
| 2,5    | 8               | — 2            | — 16 | 32               |
| 3      | 34              | — 1            | — 34 | 34               |
| A=3,5  | 37              | 0              | — 50 | 0                |
| 4      | 14              | 1              | 14   | 14               |
| 4,5    | 4               | 2              | 8    | 16               |
| 5      | 3               | 3              | 9    | 27               |
|        | 100             |                | — 31 | 127              |

$$f \times d = 31 - 50 = -19$$

$$f \times d^2 = 127$$



# Media aritmetica

$$m = A + B, A_c = 3.5 + (-0.19 \cdot 0.5) = 3.5 - 0.095 = 3.405$$

## Error probable de la media

$$\epsilon_m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = \pm \frac{0.0555}{\sqrt{100}} = \pm \frac{0.0555}{10} = \pm 0.00555$$

## Desviación típica

$$\sigma = \left( \pm \sqrt{\frac{\sum f \cdot d^2}{N}} \right) A_c = \left( \pm \sqrt{\frac{127}{100} - 0.0361} \right) 0.5 = \pm 0.0555$$

## Error probable de la desviación típica

$$\epsilon_\sigma = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{2N}} = \pm \frac{0.0555}{\sqrt{200}} = \pm \frac{0.0555}{14.14} = \pm 0.0039$$

## Coefficiente de variabilidad

$$v = \frac{\sigma - 100}{M} = \frac{0.0555 \cdot 100}{3.405} = \frac{5.55}{3.405} = 1.62\%$$

## Error probable del coeficiente de variabilidad

$$\epsilon_v = \frac{v}{\sqrt{2N}} = \pm \frac{1.62}{\sqrt{200}} = \pm 0.114$$

| Clases | Frecuencias (f) | Desviación (d) | f d  | f d <sup>2</sup> |
|--------|-----------------|----------------|------|------------------|
| 3,5    | 2               | - 6            | - 12 | 72               |
| 4      | 3               | - 5            | - 15 | 75               |
| 4,5    | 3               | - 4            | - 12 | 48               |
| 5      | 6               | - 3            | - 18 | 54               |
| 5,5    | 11              | - 2            | - 22 | 44               |
| 6      | 12              | - 1            | - 12 | 12               |
| <hr/>  |                 |                |      |                  |
| A=6,5  | 17              | 0              | - 91 | 0                |
| 7      | 6               | + 1            | 6    | 6                |
| 7,5    | 10              | + 2            | 20   | 20               |
| 8      | 14              | + 3            | 42   | 126              |
| 8,5    | 10              | + 4            | 40   | 160              |
| 9      | 6               | + 5            | 30   | 150              |
| <hr/>  |                 |                |      |                  |
|        | 100             |                | +138 | 767              |

$$f \times d = 138 - 91$$

$$f \times d^2 = 767$$

Segunda experiencia.—Determinación de las constantes biométricas correspondientes a la anchura y longitud de los espermatozoides de preparaciones procedentes de material seminal, de los tubos seminíferos; teñidas por el método de Gram-FUMAGALLI.

a) Medidas correspondientes a la longitud de los espermatozoides y valores de las respectivas constantes biométricas.

b) Valores correspondientes a la anchura del espermatozoide y resultados de las constantes biométricas.

# Media aritmetica

$$m = A + B, A_c = 6.5 + 0.47 \cdot 0.5 = 6.5 + 0.235 = 6.735$$

## Error probable de la media

$$\epsilon_m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = \pm \frac{1.36}{\sqrt{100}} = \pm \frac{1.36}{10} = \pm 0.136$$

## Desviación típica

$$\sigma = \left( \pm \sqrt{\frac{\sum f \cdot d^2}{N}} \right) A_c = \left( \pm \sqrt{\frac{767}{100} - 0.2209} \right) 0.5 = \pm 1.36$$

## Error probable de la desviación típica

$$\epsilon_\sigma = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{2N}} = \pm \frac{1.36}{\sqrt{200}} = \pm \frac{1.36}{14.14} = \pm 0.096$$

## Coefficiente de variabilidad

$$v = \frac{\sigma \times 100}{M} = \frac{1.36 \times 100}{6.735} = \frac{136}{6.735} = 20.19\%$$

| Clases | Frecuencias (f) | Desviación (d) | f d  | f d <sup>2</sup> |
|--------|-----------------|----------------|------|------------------|
| 1,5    | 2               | - 3            | - 6  | 18               |
| 2      | 7               | - 2            | - 14 | 28               |
| 2,5    | 24              | - 1            | - 24 | 24               |
| <hr/>  |                 |                |      |                  |
| A=3    | 30              | 0              | - 44 | 0                |
| 3,5    | 21              | 1              | 21   | 21               |
| 4      | 16              | 2              | 32   | 64               |
| <hr/>  |                 |                |      |                  |
|        | N = 100         |                | + 53 | 155              |

$$f \times d = 53 - 44 = 9$$

$$f \times d^2 = 155$$

### Media aritmetica

$$m = A + B \cdot A_c = 3 + 0.09 \cdot 0.5 = 3 + 0.045 = 3.045$$

### Error de la media

$$\delta m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = \pm \frac{0.62}{\sqrt{100}} = \pm \frac{0.62}{10} = \pm 0.062$$

### Desviación típica

$$\sigma = \left( \pm \sqrt{\sum f d^2 - B^2} \right) \cdot A_c = \left( \pm \sqrt{\frac{155}{100} - 0.0081} \right) \cdot 0.5 = \pm 1.24 \cdot 0.5 = \pm 0.62$$

### Error probable de la desviación típica

$$\delta \sigma = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{2N}} = \frac{0.62}{\sqrt{200}} = \frac{0.62}{14.14} = \pm 0.048$$

### Coefficiente de variabilidad

$$v = \frac{\sigma \times 100}{M} = \frac{0.62 \cdot 100}{3.045} = \frac{62}{3.045} = 20.36\%$$

### Error probable del coeficiente de variabilidad

$$\delta v = \pm v \sqrt{\frac{1 + 2 \left( \frac{100}{v} \right)^2}{2N}} = \pm 20.36 \sqrt{\frac{1 + 2 \left( \frac{100}{20.36} \right)^2}{200}} = \pm 20.36 \times 0.0496 = \pm 10.09856$$

Tercera experiencia.—Determinación de los valores: longitud y anchura de las cabezas espermáticas en preparaciones hechas con semen procedente de los tubos seminíferos y gram negativos con respecto al método de tinción ya indicado; en esta experiencia, como en las anteriores, las mediciones se han llevado a cabo sobre 100 espermatozoides.

| Clases | Frecuencias (f) | Desviación (d) | f d                      | f d <sup>2</sup> |
|--------|-----------------|----------------|--------------------------|------------------|
| 4      | 2               | -4             | -18                      | 32               |
| 4,5    | 2               | -3             | -6                       | 18               |
| 5      | 9               | -2             | -18                      | 36               |
| 5,5    | 10              | -1             | -10                      | 10               |
| A=6    | 49              | 0              | -52                      | 0                |
| 6,5    | 11              | 1              | 11                       | 11               |
| 7      | 10              | 2              | 20                       | 40               |
| 7,5    | 4               | 3              | 12                       | 36               |
| 8      | 3               | 4              | 12                       | 48               |
|        | 100             |                | +55                      | 231              |
|        |                 |                | f X d = 55 - 52 = 3      |                  |
|        |                 |                | f X d <sup>2</sup> = 231 |                  |

### Media aritmetica

$$m = A + B \cdot A_c = 6 + 0.13 \cdot 0.5 = 6 + 0.065 = 6.065$$

### Error probable de la media

$$\delta m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = \pm \frac{0.755}{\sqrt{100}} = \pm \frac{0.755}{10} = \pm 0.0755$$

### Desviación típica

$$\sigma = \left( \pm \sqrt{\sum f d^2 - B^2} \right) \cdot A_c = \left( \pm \sqrt{\frac{231}{100} - 0.0169} \right) \cdot 0.5 = \pm 1.51 \cdot 0.5 = \pm 0.755$$

### Error probable de la desviación típica

$$\delta \sigma = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{2N}} = \pm \frac{0.755}{\sqrt{200}} = \pm \frac{0.755}{14.14} = \pm 0.053$$

### Coefficiente de variabilidad

$$v = \frac{\sigma \cdot 100}{M} = \frac{0.755 \cdot 100}{6.065} = \frac{75.5}{6.065} = 12.44$$

### Error probable del coeficiente de variabilidad

$$\delta v = \pm 12.44 \sqrt{\frac{1 + 2 \left( \frac{100}{12.44} \right)^2}{200}} = \pm 12.44 \cdot 0.006 = \pm 10.02664$$

a) Valores correspondientes a la longitud de la cabeza de los espermatozoides gram negativos procedentes de material seminal y sus constantes biométricas.

b) Valores y constantes biométricas correspondientes a la anchura de los espermatozoides gram negativos objeto de la tercera experiencia.

| Clases | Frecuencias (f) | Desviación (d) | f d                      | f d <sup>2</sup> |
|--------|-----------------|----------------|--------------------------|------------------|
| 1,5    | 8               | -3             | -24                      | 72               |
| 2      | 10              | -2             | -20                      | 40               |
| 2,5    | 12              | -1             | -12                      | 12               |
| A=3    | 56              | 0              | -56                      | 0                |
| 3,5    | 7               | 1              | 7                        | 7                |
| 4      | 3               | 2              | 6                        | 12               |
| 4,5    | 2               | 3              | 6                        | 18               |
| 5      | 2               | 4              | 8                        | 32               |
|        | 100             |                | 27                       | 193              |
|        |                 |                | f X d = -56 + 27 = -29   |                  |
|        |                 |                | f X d <sup>2</sup> = 193 |                  |



Media aritmetica

$$m = A + e \cdot A_c = 3 + (29.05) = 3 - 0.145 = 2.855$$

Error probable de la Media

$$\epsilon_m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = \pm \frac{0.675}{\sqrt{100}} = \pm \frac{0.675}{10} = \pm 0.0675$$

Desviación típica

$$\sigma = \left( \sqrt{\frac{\sum f \cdot d^2}{N} - e^2} \right) \cdot A_c = \left( \sqrt{\frac{193}{100} - 0.0841} \right) \cdot 0.5 = \pm 1.35 \cdot 0.5 = \pm 0.675$$

Error probable de la desviación típica

$$\epsilon_\sigma = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{2N}} = \pm \frac{0.675}{\sqrt{200}} = \pm 0.047$$

Coefficiente de variabilidad

$$v = \frac{\sigma}{M} = \frac{0.675}{2.855} = \frac{67.5}{281.6} = 23.64\%$$

Error probable del coeficiente de variabilidad

$$\epsilon_v = \pm v \sqrt{\frac{1 + 2\left(\frac{100}{v}\right)^2}{2N}} = \pm 23.64 \sqrt{\frac{1 + 2\left(\frac{100}{23.64}\right)^2}{200}} = \pm 23.64 \cdot 0.428 = \rightarrow \pm 10.11792$$

Cuarta experiencia.—Determinación de los valores en micras correspondientes a la longitud y anchura de las cabezas de espermatozoides, de la variedad "granulosa", en preparaciones procedentes de material testicular (tubos seminíferos) teñidos por el método de Gram-FUMAGALLI.

a) Medidas y constantes biométricas correspondientes a la longitud de los citados espermatozoides relativas a la cabeza.

| Clases | Frecuencias (f) | Desviación (d) | f d  | f d <sup>2</sup> |
|--------|-----------------|----------------|------|------------------|
| 4      | 1               | — 4            | — 4  | 16               |
| 4,5    | 2               | — 3            | — 6  | 18               |
| 5      | 4               | — 2            | — 8  | 16               |
| 5,5    | 6               | — 1            | — 6  | 6                |
| A=6    | 32              | 0              | — 24 | 0                |
| 6,5    | 17              | 1              | 17   | 17               |
| 7      | 19              | 2              | 38   | 76               |
| 7,5    | 11              | 3              | 33   | 99               |
| 8      | 8               | 4              | 32   | 128              |
|        | 100             |                | 120  | 376              |

$$\begin{aligned} f \times d &= 120 - 24 = 96 \\ f \times d^2 &= 376 \end{aligned}$$

Media aritmetica

$$m = A + e \cdot A_c = 6 + 0.96 \cdot 0.5 = 6 + 0.48 = 6.48$$

Error probable de la media

$$\epsilon_m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = \pm \frac{0.84}{\sqrt{100}} = \pm \frac{0.84}{10} = \pm 0.084$$

Desviación típica

$$\sigma = \left( \sqrt{\frac{\sum f \cdot d^2}{N} - e^2} \right) \cdot A_c = \left( \sqrt{\frac{376}{100} - 0.9216} \right) \cdot 0.5 = \pm 1.68 \cdot 0.5 = \pm 0.840$$

Error probable de la desviación típica

$$\epsilon_\sigma = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{2N}} = \pm \frac{0.84}{\sqrt{200}} = \pm \frac{0.84}{14.14} = \pm 0.059$$

Coefficiente de variabilidad

$$v = \frac{\sigma}{M} = \frac{0.84}{6.48} = \frac{84}{648} = 12.96\%$$

Error probable del coeficiente de variabilidad

$$\epsilon_v = \pm v \sqrt{\frac{1 + 2\left(\frac{100}{v}\right)^2}{2N}} = \pm 12.96 \sqrt{\frac{1 + 2\left(\frac{100}{12.96}\right)^2}{200}} = \pm 12.96 \cdot 0.77 = \rightarrow \pm 9.9792$$

b) Medidas y valores biométricos correspondientes a las anchuras en cabeza de los espermatozoides "granulosos" correspondientes a la cuarta experiencia.

| Clases | Frecuencias (f) | Desviación (d) | f d  | f d <sup>2</sup> |
|--------|-----------------|----------------|------|------------------|
| 1,5    | 6               | — 3            | — 18 | 54               |
| 2      | 10              | — 2            | — 20 | 40               |
| 2,5    | 26              | — 1            | — 26 | 26               |
| A=3    | 40              | 0              | — 64 | 0                |
| 3,5    | 10              | + 1            | 10   | 10               |
| 4      | 8               | + 2            | 16   | 32               |
|        | 100             |                | + 26 | 162              |

$$\begin{aligned} f \times d &= -64 + 26 = -38 \\ f \times d^2 &= 162 \end{aligned}$$



Media aritmética

$$m = A + b, A_c = 3 + (-0.38 \cdot 0.5) = 3 - 0.19 = 2.81$$

Error probable de la media

$$\sigma_m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = \pm \frac{0.605}{\sqrt{100}} = \pm \frac{0.605}{10} = \pm 0.0605$$

Desviación típica

$$\sigma = \left( \pm \sqrt{\frac{\sum f \cdot d^2}{N}} \right) A_c = \left( \pm \sqrt{\frac{167}{100} - 0.1444} \right) 0.5 = \pm 1.21 \cdot 0.5 = \pm 0.605$$

Error probable de la desviación típica

$$\sigma_\sigma = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{2N}} = \pm \frac{0.605}{\sqrt{200}} = \frac{0.605}{14.14} = \pm 0.042$$

Coefficiente de variabilidad

$$v = \frac{\sigma \cdot 100}{M} = \frac{0.605 \cdot 100}{2.81} = \frac{60.5}{2.81} = 21.53\%$$

Error probable del coeficiente de variabilidad

$$\sigma_v = \pm 21.53 \sqrt{\frac{1 + 2 \left( \frac{100}{21.53} \right)^2}{200}} = \pm 21.53 \cdot 0.469 = \pm 10.09757$$

Conclusiones.—1.<sup>a</sup> a) Las medidas correspondientes a la longitud de la cabeza en los espermatozoides gram positivos procedentes de un eyaculado normal, presentan los siguientes valores:

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Media aritmética ... ..          | 6,995 micras |
| Desviación típica ... ..         | 1,07 "       |
| Coefficiente de variabilidad ... | 15,29 %      |

b) Las dimensiones correspondientes a la anchura de las cabezas de espermatozoides gram positivos del eyaculado normal presentan los siguientes valores:

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Media aritmética ... ..          | 3,405 micras |
| Desviación típica ... ..         | 0,0039 "     |
| Coefficiente de variabilidad ... | 1,62 %       |

2.<sup>a</sup> a) La longitud de la cabeza de los espermatozoides gram positivos en preparaciones hechas con material de los tubos seminíferos arroja los siguientes valores:

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Media aritmética ... ..          | 6,735 micras |
| Desviación típica ... ..         | 1,36 "       |
| Coefficiente de variabilidad ... | 20,19 %      |

b) Los valores correspondientes a la anchura de los espermatozoides anteriormente mencionados y referida a la cabeza, presenta los siguientes valores:

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Media aritmética ... ..          | 3,045 micras |
| Desviación típica ... ..         | 0,62 "       |
| Coefficiente de variabilidad ... | 20,36 %      |

3.<sup>a</sup> a) Los valores correspondientes a la longitud de la cabeza de los espermatozoides gram negativos procedentes de los tubos seminíferos, presentan los valores siguientes:

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Media aritmética ... ..          | 6,065 micras |
| Desviación típica ... ..         | 0,755 "      |
| Coefficiente de variabilidad ... | 12,69 %      |

b) Los valores correspondientes a la anchura de espermatozoides gram negativos procedentes de los tubos seminíferos, son los siguientes:

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Media aritmética ... ..          | 2,855 micras |
| Desviación típica ... ..         | 0,675 "      |
| Coefficiente de variabilidad ... | 23,64 %      |

4.<sup>a</sup> a) Los valores correspondientes a la longitud de la cabeza en los espermatozoides pertenecientes a la variedad granulosa y procedentes de los tubos seminíferos, son los siguientes:

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Media aritmética ... ..          | 6,480 micras |
| Desviación típica ... ..         | 0,840 "      |
| Coefficiente de variabilidad ... | 12,44 %      |

b) La anchura correspondiente a la cabeza de los espermatozoides anteriormente indicados, presenta los siguientes valores:

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Media aritmética ... ..          | 2,810 micras |
| Desviación típica ... ..         | 0,0605 "     |
| Coefficiente de variabilidad ... | 21,53 %      |

5.<sup>a</sup> Se aprecia un incremento en las dimensiones de la cabeza en los espermatozoides, desde la variedad gram negativa hasta que alcanza la gram positividad, pasando por la variedad granulosa. Este incremento es más notable en la longitud de la cabeza que en la anchura; los valores adquieren el siguiente cuadro.

|                       |              |              |
|-----------------------|--------------|--------------|
| Gram positivos ... .. | 6,735 micras | 3,045 micras |
| Granulosos ... ..     | 6,480 micras | 2,810 micras |
| Gram negativos ... .. | 6,065 micras | 2,850 micras |

Resulta, por tanto, evidente, que junto al ciclo cromocitológico de la maduración espermática (ciclo cefálico de BONADONNA), existe al menos en esta especie, otro ciclo morfofisiológico, consistente en un incremento de las dimensiones cefálicas al pasar de la variedad gram negativa a la granulosa y de ésta a la gram positiva.



## RESUMEN:

El autor estudia el número de espermatozoides Gram-positivos y la sucesiva transformación de los Gram-negativos a Gram-positivos a lo largo del tractus genital así como la variación del porcentaje de ambas formas según la frecuencia en eyaculado.

Estudia así mismo las medidas correspondientes a longitud y altura en las cabezas de los espermatozoides Gram-positivos, y Gram-negativos en el eyaculado y los tubos seminíferos.

### Résumé No. 8

L'auteur étudie le nombre de spermatozoïdes appelés gram-positif la transformation successive des spermatozoïdes appelés gram-négatifs à leur opposé positif au long du canal génital. De la même façon il soumet à l'étude la variation du pourcentage entre les deux formes en mettant l'accent sur la fréquence de ces éléments dans chaque éjaculation. En plus, il étudie les dimensions correspondantes (longueur et altitude) des têtes des spermatozoïdes appelés gram-positifs et celles des spermatozoïdes appelés gram-négatifs et granuleux des éjaculations; il mesure également les tubes semenaux.

### Summary No. 8

The author is studying the number of gram-positive spermatozoides and the successive transformation of the gram-negative spermatozoides into gram-positive ones all the way along the genital tractus. He also studies the variation of the percentage of both forms in connection with the frequency in each ejaculation. He likewise examines the corresponding dimensions (length and height) of the heads of the gram-positive spermatozoides and those of the granulous and gram-negative spermatozoides of the ejaculations; he also measures the seminal tubes in use.

### Inhaltsangabe No. 8

Der Verfasser studiert hier die Anzahl von gram-positiven Spermatozoiden und die fortschreitende Verwandlung der gram-negativen Spermatozoiden in die entsprechenden positiven Spermatozoiden laengs des Genitalkanals. Er studiert gleichweise die Variation im Verhaeltnis beider Formen im Zusammenhang mit der Haeufigkeit ihres Auftretens in jeder Ejakulation. In aechdnlicher Weise ueberprueft er die entsprechenden Dimmensionen (Laenge und Hoezhe) der gram-positiven Spermatozoidenkoepfe, der granuloesen und gram-negativen Spermatozoidenkoepfe in den Ejakulationen sowie die Samentuben in Verwendung.

## BIBLIOGRAFIA

- 1—BELONOSCHKIN.—1952.—Biologie des Spermatozoen inmensichle: Hoden und Nebenhoden.—Arch. f. Gynaek 3:174.

- 2.—BENEDICT.—1940.—Enumeration of spermatozoids.—Med. Jour., Vol. XCI. Nueva York.
- 3—BONADONNA.—1937.—Ricerca sperimentale sulla fecondazione artificiale degli ovine.—Congresso Nazionale Armentario. Roma.
- 4—CHIODI.—1939.—L'istofisiologia dello sperma.—Atti 1.<sup>a</sup> Ad. Naz. Vet. per la Fec. Art. Pavia.
- 5—DAS NEVES, E. y CASTRO.—1939.—O problemas de técnica da inseminação Artificial.
- 6—LESBOURYRIES.—1949.—Reproduction des mamifères domestiques.—M. E. Paris.
- 7—POPA Y MARZA.—1929.—Variations de la gaine lipidique des spermatozoides et quelques particularités structurales de ces cellules. Com. Rend. Soc. Biol.—Paris.
- 8—BLOM, E.—1943.—A new uncomplicated method for the staining of bull sperms.—Skandin Veterinartidskr.
- 9—BLOM, E.—1945.—Spontaneous detachment of the galea capitis in spermis of bull and stallion.—Skandin Veterinartidskr.—I I.
- 10—BLOM, E.—1950.—On the evaluation of bull semen with especial reference to its employment for artificial insemination.—J. K. II. 10—25.
- 11—BLOM E. y CHRISTENSEN, N. O.—1951.—Congenital absence of the epididymis dustus deferens of glandula vesicularis in the bull Roy. Vet and Agric College Yearbook
- 12—BLOM E. y CHRISTENSEN, N. O.—1947.—Studies on pathological conditions in the testis, epididymis and accessory sex glands in the bull.—Skandin Veterinartidskr.
- 13—BONADONNA, FUMAGALLI.—1941.—Su un nuovo reperto ottenuto col metodo di GRAM nella testa dello spermatozoo di bos taurus durante il ciclo detto periodo di maturazione nelle vie genitali Fec. Art. anno III, núm. 9.
- 14—BLUMENSCHNEIN, R.—1948.—Untersuchungen ueber die Färbbarkeit der Spermien des Stieres.—Dis. Tierat Hochsch Vienna, Rec. An. Breed. Abst. Vol. 19, núm.3.
- 15—CHADDUCK, T. T.—1950.—Proper technique and value of sperm checking.—Amer. Fur. Breeder. Vol. 23.
- 16—BONADONNA, RIMOLDIA.—1941.—Osservazioni sulla produzione spermatica dei tori da macello in rapporto alla razza all'età al peso vivo.—Azione Vet. anno X.
- 17.—BRETSCHNEIDER, I. H.—1948.—Morphological investigation of bull sperm within the framework of artificial insemination.—Zool. Ins. Univ. Utrecht.
- 18—BROCHART, M. MONTROSE, S. M.—1951.—Morphologie nor-



- male et anormale du spermatozoide de taureau.—Rec. Med. Vet. Tome 127 núm. 8 aout.
- 19—BRETSCHNEIDER, L. H.—1950—Elektronen mikroskopische Strukturuntersuchung an Spermien.—Pro Acad Sci Amst Vol. 53.
- 20—BUSCHK. R.—1939.—Vergleichenden morphologische und mikropathologische Studien über Spermien und den ableitenden Samenweg bei Carnivoren.—Inaugural.—Dissert. zur Erlangd. Doktorwurde an der Fr. Wilh. Univ. Berlin.
- 21—BRANTONN, C, SALISBURY, L.—1947.—Morphology of spermatozoa from different levels of the reproductive tract of the bull.—J. of An. Sci. Vol. 6, núm. 2, mayo.
- 22—BRANTON, D.; JAMES, C. B.; PATRIK, T. E.; NEWSON, M. H.; 1951.—The relationships between certain semen quality test and fertility and the interrelationship of these test.—J. Dairy Sci. Vol. 34, núm. 4.
- 23—BRANTON, C.; BRANTON, R. W.; SALISBURY, G. W.; 1945. Semen production and fertility of dairy bulls fed rations containing proteins of plant and animal origin.—J. Dairy Sci. Vol. 32, 4.
- 24—HANCOCK, J. L.—1951.—A staining technique for the study of temperature-shock in semen.—An. Res. Sta. Agr. Res. Coun. Cambrid.
- 25—GRAMAGDIAL, ROBECCHI, M.—1950.—Sul criterio valutativo della fertilità spermatica.—Minerva Gyn. Vol. II.
- 26—FUMTGALLY, Z.—1941.—A proposito di alcune modificazioni strutturali della testa dello spermatozoo di bos taurus.—Rendiconti del R. Ist. Lomb. Sci. e Lett. Vol. 75, 6.<sup>a</sup> della Ser. III.
- 27—SCHENBRENNER, A. B. MILLER, S.—1950. — Effect of engen rays on the testis. Quantitative histological analysis following whole body exposure of mice.—Arc. Path. Vol. 5.
- 28—ERB, R. E.; ANDRWS, F. N.; BULLARD, J. F.; HILTON; J. H.—1944.—A technique for simultaneous measurement of semen quality and testis histology in vitamin A. studies of the dairy bull.—J. Dairy Sci. Vol. 27, núm. 9.
- 29—DAVINO, S.—1942.—Ricerche sull'involucro della testa dei nemaspermi equini.—Riv. Mil. Di. Med. Vet.
- 30—COMSTOCK, R. E.; GREEN, W. W.; WINTER, L. M.; NORDKOG, A. W.—1953.—A studies of semen production.—Univ. of Minnesota Tech. Bull 162.
- 31—HIRSCHLER, J.; MONNE, L.—1933.—Les granules colorables sur le vivant dans les cellules sexuelles males des mammiferes. C. R. Soc. Biol. núm. 112.
- 32—HOTCHKISS, R.—1941.—Factors in stability and variability

- of semen specimen. Observations on 640 samples from 23 men. J. of Urol. Vol. 45.
- 33—ITO, S.; NIWA, T.; KUDO, A.—1948.—On the quantity of semen and the number of spermatozoa to be introduced the litter size, etc., in the artificial insemination on swine.—Jap. J. Zootech, Sci. Vol. 19. núm. 1-4.
- 34—KARRAS, W.—1950.—Spermastudien I mitt. Eine Methode zur farberischen Darstellung der Kopfkappen und des kolloidüberzuges der Spermien.—Monatshefte. f. prakt. Tierheilk B. 2H. 2.
- 35—KARRAS, W.—1951.—Spermastudien II. Mitt. Die biologische Aufgabe der Kopfkappen der Spermien.—Monatshefte. f. prakt. Tierheilk B. 3H. 3.
- 36—KARRAS, W.—1952.—Die Spermiodensimeter seine Entwicklung und Anwendung. Fortpflanzung und Besamung der Haustiere. Jarrag 2H. 1.
- 37—KOZELUHA, V. L.—1940.—Ueber die Entleerung des Nebenhodens bei wiederholten Ejakulationen und seine Wiederanfüllung.—Zeitschr für Tierzucht u. Zuchtungsbiol B. 48 H.
- 38—KUST, D.—1939.—Erfahrungen mit der Sperma-Verdünnungsflüssigkeit.—Sp. V. 161 der Behringwerke. Tierärztl Umschau n. 9-10.
- 39—KUST, D.—1939.—Kontrolle und Aufbewahrung des Spermas. Tierärz Rundsch.
- 40—KROKLING, O.—1951.—Ueber die Samengewinnung, prüfung und pflege Wiener Tierärztl Montsschr. Vol. 38. núm. 5.
- 41—LAGERLOF, N.—Morphologische Untersuchungen über Veränderungen im Spermabild und in den Hoden bei Bullen mit verminderter oder aufgehobener.—Fertilitar Acta Patch-Microbiol Scand. Sppl. 19.
- 42—MAQSOOD, M.—1951.—Observations on sataing affinity and morphology of mammalian spermatozoa.—Experiencia, vol. 7-8.
- 43—MAQSSOD, M.—1952.—An abnormality of mammalian spermatozoa. Experiencia vol. 7-8.
- 44—MARCQ; HERNNAUX, L.; DIMITRO-POULOS, E.—1947. Consideration sur la morphologie des spermatozoides chez le taureau.—Bull Ins Agr. et Stat Rech. Gembloux t. 16 n. 117.—
- 45—MARZA, V.—1931.—Structure et histochimie du spermatozoide. Bull Hist. Appli. ala Phisid et a la Pathol. t. 8.
- 46—MASCIOTTA A MIOTTI, T.—1941.—Sulla morfologia dei nemaspermi disoggetti colpiti da solfocarbonismo benzolismo e saturnismo.—Rass Med. Industr. n. 12.
- 47—BUIKO-ROGALEVIC, A. N.—1950.—Dlitelinoe hranenie spermy zarebca Konevodstvo.—Vol. 5. Rec. And Breed Abst Vol 18, n. y.



- 48—MASUDA, S.—1940.—Studies on the bull's spermatozoa with special reference to their fertility. II. Studies on the oestrus in the cow.—Bull. n. 56. March.
- 49—MERCIER, H.—1944.—The relationship between the proportion of morphologically abnormal spermatozoa and other criterion of bull sperm.—These de Doctorat Ithaca. New-York.
- 50—MERTON, H.—1938.—Studies on reproduction in the albino mouse II Contribution on the maturation of the sperm cells. Proc. Roy Soc. Adinb. Vol. 59.
- 51—SHAFFER, H. E. ALMQUIST.—1948.—Vital staining of bovine spermatozoa with an eosinoline blue staining mixture Paper at 43rd Ann Meeting of Am Dairy Sci. Sss. J. Dairy Sci. vol. 31 n. 8.
- 52—SPEELMAN, S. R.; DAWSON, W. M.; PHILIPS, R. W.—1944.—Some aspects of fertility in horses raised under western range conditions, J. of An Sci. vol. 3, n. 3.
- 53—TESORIERE, A.; INFANTELLINA, F.—1946.—Su alcuni caratteri morfologici e biochimici del liquido seminale di soggetti umani normali.—Boll. Soc. It. Biol. Sper. Vol. 22, fasc. 6.
- 54—TESORIERE, A.; INFANTELLINA, F.—1946.—Su alcuni caratteri morfologici e biochimici del liquido seminale di soggetti umani con alterazione del didimo ed annessi per affezioni o interventi chirurgicilocali.—Boll. Soc. It. Biol. Sper. vol. 22, fasc. 7.
- 55—WAGENAAR, G.; GROOTENHUIS, G.—1951.—Het spermatonderzoek bij hengsten en het kunstmatig insemineren van merriën.—Tijdschr Diergeneesk vol. 76. An. Br. Abstr. vol. 20, n. 1.
- 56—WALTON, A.—1939.—Preservation of fertilizing capacity of horse semen.—Am. Soc. An Prod.
- 57—YAMANE, J.—1935.—Körpergrösse und Spermiengrösse Eine vergleichende Untersuchung über die Grösse der Spermien beim Pottwal Pferd und Daninchen.—Tierzucht u. Zuchtunbs. biol. vol. 34. n. 1.
- 58—MICHAEL, M.; JOEL, K.—1937.—Zellformen im normalen und pathologischen Ejakulat und ihre klinische Bedeutung.—Schw. Med. Wschr. vol. 67.
- 59—MONCH, G.—The technique of the detailed study of seminal cytology Amer.—J. Obst Gynec. 19.
- 60—MORRIS, P. G. O.—1950.—Examination of bull semen with the ordinary and phase contrast microscopes.—Brit. Vet. J. vol. 106, n. 3.
- 61—MURATORI, G.; CONTRO, S.—Osservazioni sui movimenti del canale dell'epididimo.—Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. vol. 27, n. 4.
- 62—PLANA, G.—1947.—Influenza della asportazione cresta e die

- bargigli sul peso dei testicoli e sulla spermatogenesi.—Zoot. e Vet. vol. 2, n. 9.
- 63—PARAT, M.—1939.—Nomenclature genese structure et fonction de quelques elements cytoplasmiques des cellules sexuelles males.—C. R. Soc. Biol. 112. 1131.
- 64—NISHIKAWA, A.; SUGIE, T.—1949.—Studies on artificial insemination in the horse. II the resistance against temperature.—Jap. Zootecg Sci. vol. 20 n. 4.
- 65—NISHIKAWA, Y.; SASAKI, Y.—1946.—Studies on the resistance of the osmotic pressure of diluents on the viability of spermatozoa in vitro.—Jap. J. Vet. Sci.
- 66—POLLOK, O.; JOEL, C.—1938.—Zur morphologie der männlichen Keimzellen Arch. f. Exp. Zellforsch. vol. 22.
- 67—POPA, G. R.; MARZA, V.—1929.—La phagocytose des spermatozoïdes par les elements cellulaires du tractus genital de la femelle.—C. R. Soc. Biol. vol. 101.
- 68—REDENZ, E.—1924.—Saggio di una morfologia biologica dell'epididimo. A Letterata ed esposizioni del problema sul significato dell'epididimo.—Arch. Mikr. Ant u Entw. Mech. 103.
- 69—RENSBURG VAN, S. W. J.; STARKE, N. C.—1949.—The examination of bull semen.—J. Of. S. A. V. M. V. vol. 20, n. 2.
- 70—RANDALL, J. T.; FRIEDRAENDER, M. H. G.—1951.—The microstructure of ram spermatozoa.—Rec. An. Breed. Abst. vol. 19, n. 2.
- 71—GONZALEZ ALVAREZ, R.—1943.—Elementos de estadística biométrica.
- 72—SCHELLER BARBOSA, H. O.—1950.—Observações e sugestões sobre a inseminação artificial em equídeos.—Inst. Zootz. Publ. núm. 10.
- 73—SAGAVE, A.; WILLIAMS, W. L.; FOWR, S. M.—1930.—A study of the head length variability of equine spermatozoa.—Canad. J. of Res. vol. 3.
- 74—ROLSHOVES, E.—1940.—Die funktionelle Polymorphie des Sertolisyncytiums und ihr Zusammenhang mit der Spermatogenese.—Ztschr. Zellforsch. vol. 31.
- 75—ROLLISSON, D. H. L.—1951.—Studies on the abnormal spermatozoa of bull semen. II. Incidence of types of abnormalities in semen British.—Vet. J. vol. 107, núm. 6.
- 76—ROLLINSON, D. H. L.—1951.—Studies on the abnormal spermatozoa of bull semen I Brit. Vet. J. vol. 107 núm. 5.
- 77—POPA, G. R.; MARZA, V.—La maturazione dei nemaspermii nella coda dell'epididimo e la capsula lipoide.
- 78—BERNSTEIN, A.—1933.—Problema of artificial intermination.
- 79—BONADONNA.—La inseminazione artificiale.—1944.



- 80—DOKUNDOWSKI, E. N.—1934.—Cuatro años de fecundación en la vaca en la Est. Ve de S-pazek.
- 81—EVANS, E. I.—1933.—The transport of spermatozoa in the dog.—Am. J. Physiol.
- 82—FALASCINI.—1934.—Ricerche sulla concentrazione idrogenica del secreto vaginale della bovina sterile.—Clin. Vet.
- 83—MARTELLI.—1939.—La fecondazione artificiale degli animali domestici.—Pavia.
- 84—NEVES E. CASTRO.—1946.—O problema da tecnica da fecondacao artificial. Lisboa.
- 85—ANDERSON, J.—1940.—Investigations on the semen of fertility and sterile bull.—Vet. J. n. 7.
- 86—ANDERSON, J.—1930.—Vitality of spermatozoa.—Kentucky Agric. Stat. Bull. 129.
- 87—ANDERSON.—1935.—Artificial insemination in light horse breeding—Estr.
- 88—BAKER.—1930.—A fluid for mammalian Sperm. Suspensio. Quart Journ. Exp. Physiol.—20.
- 89—KARLSEN.—1933.—Lo stimulo dell'attivita sessuale negli equini di gravidanza.
- 90—BENOIT.—1936.—Anatomical citological and histo-physiological researches on the excretory ducts of the testis in mammals. Arch. Anat. Hist. Embr.
- 91—BONADONNA.—1927.—La deconda artificiale dei cavalli. L'Azione Vet.
- 92—BRANCA.—1942.—Les canalicules testiculaires et la Spermatogenesis de l'homme.—Ach. Zool.
- 93—CHIODI.—1939.—L'istofisiologia dello sperma. — Att. 1.<sup>a</sup> Ad. Maz. Vet. Pavia.
- 94—EDWARDS.—1938.—Artificial insemination the Farm. Weekly.
- 95—FRATTINI.—1940.—Mancata fusione del epididimo con divimo Ormoni núm. 10.
- 96—GEROSA.—1939.—La valutazione dello sperma nei rapporti del potere fecondante.—Atti 1.<sup>o</sup> Adn. Maz Vet.
- 97—GOBRA.—1939.—Dell controllo dello sperma.—And. Maz. Vet.
- 98—HAWKINS, DARLOW.—1934.—Histology of the reproductive tract in the.—Proc Amer. S. Anim.
- 99—KREST.—1940.—Artificial insemination.—Viterney Med.
- 100—MARZA.—1931.—Structure et histochimie du spermatozoide.
- 101—IWANOV.—1928.—Comp. ren. sec. bel 102-363.
- 102—YOEL.—1938.—Sel. Wechr. 1273.
- 103—KNAUS.—Dic. periodiche Furch Carkeitund impruchkarkeit des Weibes.

- 104—KNAUS.—1934.—Maudrich.—Viena.
- 105—KNAUS.—1932.—Arch Gynack.—151.
- 106—LARDY-AMER.—1941.—Physiol. 133-602.
- 107—MAC CLEOR.—1941.—Proc. Soc. Exper. Biol, Med, 29-583.
- 108—MANN.—1950.—Biochen. Y. 451-438.
- 109—RENDEZ.—1940.—Pflugers.—216-311.
- 110—BONADONNA.—1952.—I. Il material seminal.—Rv. Isemt. I. L. E.
- 111—BONADONNA.—1953.—Problemi tecnologici e biologici della Inseminazione Artificiale.—Milano.