

A 50 AÑOS DEL INICIO DEL SEMEN CONGELADO EN LA ARGENTINA

Raúl Roberto Roldán*. 2005. Taurus, Bs. As., 7(27):10-18.

*Médico Veterinario egresado de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires en 1945. Su extensa labor profesional ha estado relacionada con la ginecología, planificación de lucha y erradicación de enfermedades reproductivas, organización de trabajos de IA, conservación del semen "in vitro", sincronización del celo y ovulación, transferencia embrionaria, fertilización "in vitro" interespecífica y estudios citogenéticos en toros en IA. Indiscutible pionero de la inseminación artificial en el país. En 2004 recibió la primera edición del Premio Revista Taurus, en reconocimiento a su significativa contribución al desarrollo de la inseminación artificial en la Argentina.

Trabajo extraído de la monografía "Desarrollo de la tecnología del semen congelado bovino en la República Argentina", escrita por el autor en el año 2003, presentado a la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria para optar al Premio Pérez Companc- 53 páginas -Referencias bibliográficas 159.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Inseminación Artificial](#)

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de preservar el semen mediante su congelación abrió una nueva dimensión al empleo de la inseminación artificial, otorgándole más potencia aún a esta valiosa biotecnología reproductiva. En 1955 se realizaron las primeras experiencias en el país con semen congelado y es justamente su protagonista, el Dr. Raúl R. Roldán, quien las relata para Taurus en dos entregas.

Lo verdaderamente revolucionario del semen congelado no fue la ampolla, la "pastilla" o la pajuela. Estas no son más que formas de contener el semen. Lo auténticamente revolucionario ha sido lograr que los espermatozoides perduren muchos años mediante la acción crioprotectora del glicerol, lo que permitió, desde el punto de vista biológico, mantenerlos "vivos" con una longevidad prácticamente indefinida.

Esta historia comenzó para la Argentina en el año 1955 y se desarrolló con el apoyo de unos pocos, la incredulidad inicial de muchos y la oposición de algunos con intereses mezquinos y encontrados. Nació en un laboratorio sencillo y con un equipamiento autóctono y a veces rutinario y hoy se ha expandido a centros y cooperativas de Inseminación Artificial con instalaciones modernas, a veces sofisticadas, que producen anualmente trillones de dosis de semen congelado para el uso interno y de exportación. Estos centros y cooperativas no sólo producen semen para millones de vacas en inseminación artificial, sino que además hacen docencia y realizan trabajos de investigación técnica en el campo de la biotecnología reproductiva de avanzada.

INTRODUCCIÓN Y DESARROLLO DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO EN LA REPÚBLICA ARGENTINA

En el año 1947 Azzarini y Roldán (6) introducen la técnica de inseminación recto-cervical o intrauterina (hoy denominada transrectal) mediante el uso de la pipeta de vidrio ideada por Larsen en Dinamarca en 1937, y preconizada luego por Rowson en Inglaterra en 1944 (14). También en el año 1947 dichos autores introducen la mezcla dilutoria (diluyente) de yema de huevo-citrato de sodio al 3,92 % para ser utilizada en la preparación del semen refrigerado conservado a 5°C (15, 16). Este diluyente fue considerado por Salisbury como el prototipo para comparar todos los diluyentes creados. Años más tarde fue también utilizado para la congelación del semen.

En el año 1952 Roldán preconiza el tratamiento antibiótico del semen mediante el uso del sulfato de dihidroestreptomicina, luego en asociación con la penicilina, en el semen refrigerado y más tarde incorporado a los trabajos de congelación de semen (1, 2, 7, 8). El sulfato de dihidroestreptomicina fue ampliamente experimentado en la Argentina, no sólo por los beneficiosos resultados en cuanto a la inhibición del desarrollo de gérmenes en general, sino por su específica acción germicida sobre el *Vibrio foetus* (*Campylobacter*) de no frecuente investigación -por ese entonces- en nuestro medio (7).

En 1955 Roldán incorpora el tratamiento de la fructosa a la mezcla dilutoria, hasta ese momento usada en el semen refrigerado y luego incorporado a la rutina de la congelación del semen (12).

El primer antecedente conocido sobre trabajos de congelación de semen es un "informe previo" de Ras Crotto comunicado al Ateneo del Hospital de Clínicas de Animales Grandes de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires y aparecido en Gaceta Veterinaria de enero-febrero de 1954 (5). Se trataba de un informe, sin descripción de técnica, en el que presentaban dificultades de implementación. Con posterioridad, en un informe personal, comunica que había abandonado los trabajos dado los inconvenientes que se le presentaban.

Roldán, del Instituto de Genética, Reproducción e Inseminación Artificial, realiza las primeras congelaciones experimentales de semen de bovino en octubre de 1955, siguiendo los trabajos de Polge y Rowson de la escuela

inglesa (3, 4, 9), ellas continuaron con sucesivas congelaciones que fueron comunicadas a la Sociedad de Medicina Veterinaria en julio de 1956 y publicadas en la revista de esa sociedad (9).

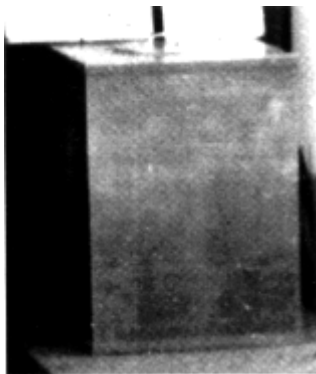
El año 1957 marca, para nuestro país, el comienzo de la aplicación de la técnica, ya en mayor escala y a la distancia. El semen fue congelado en Navarro (pcia. de Buenos Aires) y aplicado en Alberdi, sobre 260 vaquillonas, lográndose luego de tres meses de trabajo un 80 % de preñez. En el transcurso de los años 1958-59, los trabajos en gran escala se incrementaron, pues comprendieron un total de 3.975 hembras, entre vacas y vaquillonas. Los resultados fueron exitosos habiéndose trabajado con un tiempo de conservación del semen de 3 a 12 meses. A partir de estos primeros trabajos de Roldán, en gran escala y a la distancia, el campo de acción se amplía, encontrando favorable acogida entre algunos criadores (más bien por curiosidad) y de entre los cuales algunos se constituyeron luego en verdaderos pioneros.

En el año 1955, con la dirección de Roldán, se efectuó la primera importación de semen congelado que tuvo por destinatario a la Cabaña "Los Nogales" de la Administración Di Tella, de la cual era su Director el progresista y dinámico Ing. Guido Di Tella. El envío consistió en 20 dosis de semen congelado correspondientes a un toro de la raza Holando que llegó al país el 17 de abril de 1955, desde Wisconsin (EE.UU.). El semen venía acondicionado en frasquitos con un cierre a rosca, y estos frasquitos estaban depositados en una bolsa de naturaleza no definida conteniendo alcohol que, a su vez, estaban dentro de un recipiente térmico que contenía hielo seco. Sin duda alguna, esta presentación ponía en evidencia una rudimentaria aislación y sobre todo demostraba que aún se estaba experimentando en el envío de semen congelado a larga distancia. La descongelación de una ampolla permitió comprobar una recuperación de alrededor del 45 % de espermatozoides vivos; la ampolla que contenía el semen fue inmediatamente utilizada para inseminar. Datos requeridos a Wisconsin permitieron conocer algunas referencias parciales sobre la preparación de laboratorio: el semen se había diluido en leche y la dilución era de 1:40. De las 19 ampollas utilizadas (1 llegó rota) se preñaron 7 vacas, comprobadas por tacto rectal, con posterior parición.

Con posterioridad a este trabajo, evidentemente experimental pero prometedor, se recibieron sucesivos envíos y con ellos se inicia el trabajo rutinario mediante el uso del semen congelado, en un plan zootécnico y reproductivo bien planificado, comenzando así la utilización de semen congelado con reproductores considerados en el país de origen como "intransferibles". Todos estos trabajos fueron realizados por Roldán bajo cuya responsabilidad se hallaba el control reproductivo de los planteles de pedigree y puro por cruzamiento del establecimiento.

Las importaciones subsiguientes de semen congelado mostraron un notable progreso en lo que se refiere al recipiente conservador. Se evidenció una mejora substancial en la construcción y la naturaleza de los materiales de alto poder aislante utilizados en los conservadores, los cuales estaban "alimentados" con una mezcla frigorífica de alcohol y hielo seco. Los frasquitos primitivos fueron reemplazados por ampollas de vidrio cerradas a la llama y en algunas oportunidades por ampollas plásticas de polietileno. La comunicación de esta primera importación de semen congelado en ampollas, así como las posteriores importaciones, fue hecha por Roldán en "El semen congelado en la práctica diaria", en la Revista de Medicina Veterinaria, en el año 1958 (10). Con posterioridad se hicieron importaciones de semen congelado a la Cabaña "El Faisán" de Juan José Silvestre Blaquier, en trabajos dirigidos por Roldán, y a la Cabaña "La Martona", en trabajos supervisados por L. Campara.

Todos los avances logrados fueron tomados como modelo para desarrollar en el país una verdadera industria imprescindible para permitir la producción masiva de semen congelado. Esta labor fue encarada por el Instituto Veterinario ARSA, creado por Azzarini, Roldán y Sabbione -también pertenecientes al Instituto de Genética, Reproducción e Inseminación Artificial- con el propósito de servir de base a la cristalización de los trabajos de reproducción animal (ginecología bovina e inseminación artificial) desarrollados en el país por los mencionados profesionales. Esta tarea de desarrollo tecnológico de los conservadores involucró una labor realmente detectivesca, y contó con la colaboración de Juan José Silvestre Blaquier, un ganadero progresista, tesonero y "caminador", propietario de la Cabaña "El Faisán". Blaquier fue el desinteresado y tesonero colaborador con quien se logró plasmar esa realidad para esta primera etapa de desarrollo de la tecnología. En la búsqueda hubo días de logros y fracasos. Había que hacerlo todo. Desde conseguir el material aislante hasta los termos de pyrex de siete litros -su fabricación no existía en el país hasta la confección de ampollas de vidrio pyrex. Todo se logro producir como industria nacional. Mientras se desarrollaba esta búsqueda, al final de cada día, Blaquier alegremente decía: "No se si lograremos lo que estamos buscando pero sin duda alguna sí estoy seguro de que conoceremos bien la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores". Y se logró. Tiempo después estos termos fueron reemplazados por contenedores alimentados a nitrógeno líquido, actualmente en uso en el mundo entero.



Primer conservador nacional fabricado para conservar ampollas en alcohol-hielo seco, luego fabricado en serie. Este conservador se presentó en la Exposición Rural de Palermo de 1958 y contenía ampollas que se utilizaron para realizar demostraciones.



De izquierda a derecha. E. Azzarim, R. Rodríguez Otoño, R. R. Roldán, J.C. Sabbione y D. Sciarra (gerente de Arsa) en el stand de la Exposición Internacional de Palermo (1958) en donde se expusieron el primer termo nacional y la colección de piezas anatómicas (50) de aparatos genitales de hembras bovinas con anomalías de origen embriogénico y genético reunidas por Azzarini, Roldán y Sabbione por hallazgos de tacto rectal.

La primera cámara refrigerada a 5°C, requisito considerado indispensable, en esa época, para procesar semen congelado en gran escala, se construyó en el Centro de Inseminación Artificial "Carmen" de King Ranch Argentina, en el año 1960. Años más tarde, en 1971, la Cooperativa de Inseminación Artificial de Venado Tuerto (CIAVT) instalaba también una cámara climatizada a 5°C.

En el año 1957, en el Centro de Semen Congelado "Carmen", se construyeron varios aparatos eléctricos denominados "glicerolizadores", diseñados especialmente para cumplir con el proceso de "glicerolización" del semen. Esta operación consistía en la incorporación de la mezcla glicerolada a la predilución. El aparato tenía una base de discos giratorios y una parte superior fija para sostén de las buretas conteniendo la solución glicerolada, mientras en los discos giratorios se apoyaban los erlenmeyers con la predilución que contenía el semen.



Fraccionando semen en un dispositivo semiautomático, ideado por nosotros, en el interior de la cámara climatizada a 5°C. Centro de Semen Congelado "Carmen" de King Ranch Argentina situado en Cristophersen (Santa Fe). También se observa el "Glicerolizador" en uso. El aparato tenía una base de discos giratorios en los que se apoyaban los erlenmeyers con la predilución del semen y una parte superior fija para sujetar las buretas conteniendo la solución glicerolada.

Estos discos imprimían un suave movimiento giratorio y pendular del medio con el objeto de lograr una correcta dispersión de la mezcla glicerolada en la predilución del semen mediante un goteo gradual para la

protección de los espermatozoides contra el shock osmótico. La glicerolización debía realizarse en 60 minutos y a una temperatura de 5°C. Este constituía un paso fundamental para lograr el éxito. También se diseñó un fraccionador semiautomático para el llenado de las ampollas en su envasado de 1 ml de semen. Para esa época se incorpora un termo-conservador de ampollas con una capacidad de 200 litros de nitrógeno líquido que se suma a varios termos de menor capacidad ya existentes.



Termo conservador del semen congelado de una capacidad de 200 litros de nitrógeno líquido perteneciente al King Ranch Argentina y en donde además se procedía (por su boca ancha) a la congelación por medio de los vapores del N₂L.

En ese Centro de inseminación Artificial "Carmen" de King Ranch Argentina se organizaron y ejecutaron trabajos de inseminación artificial y semen congelado sobre 7.000 hembras de razas de carne británicas en un programa de cruzamiento por absorción con toros Santa Gertrudis. Fueron estos los trabajos de mayor escala realizados hasta ese momento en el país desde el año 1958. También, y desde el año 1958, en ese Centro, la comunicación entre los subcentros y el escritorio del laboratorio central se hacía mediante radioteléfono.



Secuencia que muestra la relación telefónica entre los controles administrativos (laboratorio central) y el inseminador (manga) que culmina con la inseminación (siembra) propiamente dicha. King Ranch Argentina.

Esto era muy importante para el momento de la inseminación pues ciertos datos surgidos de la "historia ginecológica" de cada vaca, tales como fecha de entrada al subcentro, fecha de último servicio, número de servicios, eran considerados junto con el toro asignado ya que esto era de riguroso cumplimiento para lograr la programación zootécnica trazada.

TRABAJO PERSONAL REALIZADO

PRIMERA IMPORTACIÓN DE SEMEN CONGELADO A LA ARGENTINA

La primera remesa recibida consistió en el envío de 20 ampollas de semen congelado de un toro Holando que llegó al país el 17 de abril de 1955 de Wisconsin (EE.UU.) con destino a Estancia y Cabaña "Los Nogales" de Suc. Torcuato Di Tella situada en Navarro (pcia. de Buenos Aires). El material llegó acondicionado dentro de una bolsa hasta hoy de características no identificadas, que a su vez se encontraba dentro de un "tarro térmico" que, presumiblemente, se encontraba lleno de hielo seco al partir de su lugar de origen, pero que al llegar al país se hallaba reducido a una cuarta parte de su contenido total. Sin duda alguna este hecho puso en evidencia la rudimentaria aislación proporcionada al semen y, por sobre todas las cosas, que aún se estaba experimentando en el envío de semen a larga distancia.

Llegado el envío la primera operación fue la de completar la carga de hielo seco hasta llenar totalmente el "tarro térmico". Luego, extremando precauciones, el recipiente fue llevado a los laboratorios de Valentín Alsina (pcia. de Buenos Aires) siendo introducido en una conservadora eléctrica que aseguraba -30°C . Se tomó esa medida a fin de aislar la caja tratando de que el consumo de hielo seco fuese mínimo. Registros continuos de la temperatura interior, tomados mediante el uso de una termocupla, permitieron comprobar que la temperatura oscilaba alrededor de los -80°C . El agregado de hielo seco cada 2 días permitió mantener completa la carga interior de la caja, aunque esta necesidad identifica el primer problema: la escasez del hielo seco en el país.

El "tarro térmico" permaneció 17 días en Valentín Alsina en esas condiciones, hasta el 4 de mayo de 1955, fecha en que se efectuó su traslado a la Estancia "Los Nogales". Ya en el establecimiento se procedió a la descongelación de una ampolla a temperatura ambiente, pudiéndose comprobar un recobramiento espermático aproximado del 45% al 50% de espermatozoides móviles. La observación fue algo dificultosa dado el inconveniente que presentaba la presencia de un diluyente que se presuponía era leche, pues en ese medio el campo microscópico no es diáfano, hecho que dificulta el estudio claro y preciso de los espermatozoides. La ampolla así descongelada fue utilizada a los treinta minutos en la inseminación de una hembra en celo. Días más tarde se procedió a la descongelación de otra ampolla en agua a 5°C , no observándose variantes dignas de mención al compararse con la anterior. En esa oportunidad el semen fue tratado con gotas de una solución de citrato de sodio al 3,92 %. Esto permitió clarificar el medio microscópico visualizándose mejor el movimiento espermático y la relación vivos-muertos. La ampolla fue utilizada en otra siembra mediante una pipeta de vidrio por técnica recto-cervical.

Datos requeridos a Wisconsin permitieron conocer algunos detalles sobre la preparación del semen. El semen se encontraba diluido en leche y la dilución efectuada había sido de 1:40.

El semen fue descongelado, en general, en agua a 5°C . La siembra fue realizada por maniobra recto-cervical ó intrauterina. De un total de 19 ampollas utilizadas (1 llegó rota) se obtuvieron 7 preñeces diagnosticadas por tacto rectal, lo que vino a significar un 40 % de preñez de primo-inseminación (11). Como dato anecdótico, merece destacarse que el primer producto nacido fue una hembra (nacida en marzo de 1956), de aspecto normal y gozando de buena salud. Su actuación en las exposiciones la consagró Campeón Ternera en Lechería de 1957 y Exposición de Rosario del mismo año. El segundo producto fue un ternero macho, también normal, y que alcanzó un Primer Premio de su categoría en las Exposiciones de Palermo y Rosario del mismo año.

IMPORTACIONES POSTERIORES DE SEMEN CONGELADO

Con posterioridad a esos primeros trabajos, que no debe dudarse de calificarse de "experimentales", sucesivas importaciones fueron recibidas por el mismo establecimiento en fechas 20 de abril y 28 de agosto de 1956 y 23 de junio de 1957 (10, 11, 13). Con ellas se intenta iniciar un trabajo rutinario mediante el uso del semen congelado sobre bases de un plan zootécnico y ginecológico, científicamente planeado.

Llegado el semen, los conservadores eran controlados para verificar la existencia del hielo seco a los efectos de proceder a su reposición debido a las pérdidas producidas por el transporte que siempre fue por vía aérea. No fue necesario observar las precauciones, tal vez excesivas, tomadas con el primer envío. Ellas fueron desechadas en forma definitiva dado el casi absoluto grado de seguridad que las conservadoras ofrecían en su nueva presentación. Los termos conservadores presentaban en su interior un termo de vidrio tipo Pyrex de gran capacidad revestido por un material aislante (poliestireno expandido) que resultó de extraordinaria eficacia práctica. En el fondo del termo venían acondicionadas las ampollas en un baño de alcohol y sobre ellas un cesto metálico con perforaciones que contenía el hielo seco. En alguna ocasión se incluía una amplia bolsa plástica de polietileno con pequeñas perforaciones para permitir que el hielo seco entrase en contacto con el alcohol. Una gruesa tapa también de poliestireno expandido completaba el conjunto. Como es fácil comprender, con este nuevo sistema de almacenamiento no sólo se ganaba en seguridad sino además en que los requerimientos periódicos del hielo seco eran menores. Evidentemente ya no se estaba improvisando en el envío a distancia.

El mantenimiento de la conservadora se realizó procediendo, cada 3 días, a la reposición de hielo seco picado, siendo su requerimiento de 7 kilos semanales. El hielo seco provenía de Buenos Aires y la provisión constituía una permanente preocupación dado la escasez de producción en el mercado. Periódicamente se controló la existencia del alcohol haciendo su reposición en una operación que consistía en el enfriamiento previo del mismo a -75°C antes de incorporarlo a la conservadora.

Se observó en estos envíos que los frasquitos de vidrio cerrados a rosca fueron reemplazados por ampollas de vidrio, cerradas a la llama, o de polietileno. Datos recibidos indicaban que en la preparación del semen se había utilizado diluciones de leche (dilución 1:40), aunque también se recibieron ampollas que incluían el uso de la mezcla buffer yema de huevo-citrato de sodio-glicerol.

La descongelación de las ampollas se realizó en agua a 5°C y antes de proceder a su apertura eran secadas con extremo celo. El semen descongelado mostró un porcentaje de recobramiento que oscilaba del 60 % al 70 % de espermatozoides de enérgica movilidad progresiva. Esta oscilación entre las ampollas observadas era considerado

por la opinión mundial y luego por el autor como normal ya que es un hecho ampliamente conocido la presencia de ampollas con distinto grado de recobramiento aunque forme parte de la misma congelación. Por otro lado era probable que el termo contuviese ampollas de diferentes congelaciones. Transcurrido un tiempo de almacenamiento, se notó una merma en el porcentaje de recobramiento del orden del 20 % y a veces más en las ampollas conservadas por 2 años. La práctica ha demostrado que esa merma va inexorablemente acompañada de un descenso de la fertilidad. Varios años más tarde los estudios realizados sobre la longevidad del semen congelado, en opiniones a veces contradictorias, confirman este hecho. A ello se hará referencia más adelante.



Estudio microscópico del semen en donde se puede apreciar las ampollas de vidrio "pirex" utilizadas como envase para la congelación del semen.

La inseminación artificial presentó las siguientes condiciones. Se trabajó sobre un lote de vaquillonas y vacas en ordeño correspondiente a 7 tambos de raza Holando Argentino. El medio (manejo y pastoreos) en que se encontraban los animales tenía falencias relacionadas con factores humanos y con las características de los suelos de la región. Las vacas puras por cruzamiento en ordeño no estaban racionadas pero sí lo estaban las del plantel de pedigree. Las vaquillonas depositadas en un lote especial eran recorridas 2 veces por día inseminando por la mañana lo detectado en la tarde anterior y por la tarde lo individualizado en esa misma mañana. Las vacas de tambo se inseminaron entre las individualizadas por el tambero durante el ordeño. El aviso de celo en los tambos se anunciaba con bandera bien visible para el inseminador en su única recorrida diaria. El registro de los servicios se realizó en planillas especiales.



Termo conservador de semen congelado de una capacidad de 400 litros de nitrógeno líquido perteneciente al Centro de Inseminación Artificial "La Elisa"(CIALE)..

Los resultados del tacto rectal se registraron en planillas de tacto.

El porcentaje de preñez (tacto rectal) obtenido en primo-inseminación para las vaquillonas fue de 55 %, mientras que para las vacas en ordeño fue del 50 %, completándose en sucesivas inseminaciones hasta llegar para las vaquillonas al 80 % y para las vacas en ordeño al 65 %. El trabajo se realizó durante casi un año. La explicación de la diferencia de preñez lograda en ambos casos no se debió, muy probablemente, a la calidad del semen congelado ni a su manipulación sino a otras razones de orden ginecológico íntimamente relacionadas a la características del establecimiento. En verdad el medio (manejo y alimentación) no era acorde con el ambicioso proyecto pionero proyectado mediante el uso del semen congelado. De hecho esa realidad ya influía en los trabajos rutinarios de la inseminación artificial con semen refrigerado a 5°C. De todas formas el esfuerzo pionero ya había cristalizado y el establecimiento se constituía en el primero en utilizar el semen congelado en forma rutinaria y masiva.

Además de constituir el primer paso para la Argentina, gozó del incalculable beneficio zootécnico que su práctica proporcionó al establecimiento al lanzarse a la conquista de la utilización de reproductores que jamás saldrían de su país de origen, e incluso presentar la anecdótica circunstancia de poder inseminar con semen de un

reproductor muerto 2 meses antes de la iniciación de los trabajos. Por otra parte este hecho constituyó el basamento que promovió el desarrollo para una tecnología autóctona que permitió disponer de conservadores que luego fueron construidos en el país y a la postre vinieron a solucionar integralmente el problema de la conservación del semen congelado en trabajos subsecuentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Easterbrooks, H.L. 1951. Fertility and Sterility 5, 430-443.
2. Easterbrooks, H.L., Heller, P, Plastridge, W.N., Jungherr, E.L., Elliott, E I. 1949. Fertility studies with streptomycin in bovine semen. J. Ani. Scie. 8, 639
3. Polge, C., Smith Audray, U., Parkes, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 164, 666.
4. Polge, C. Rowson, L.E.A. 1952. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing (-79). Nature, 169, 626.
5. Ras Crotto, P.N. 1954. La conservación del semen bovino por congelamiento. Gaceta Veterinaria, 16, 18.
6. Roldán, R.R. 1947 - 1948. Curso de Perfeccionamiento con el Prof. S. L. Hignett de la Welcome Veterinary Research Station, Frant, Sussex (Inglaterra) sobre Reproducción, Fisiopatología de la Reproducción e Inseminación Artificial en bovinos.
7. Roldán, R. R. 1954. El sulfato de dihidroestreptomina en la inseminación artificial. Parte 1. Agronomía y Veterinaria 4 (32) 9.
8. Roldán, R. R. 1955. El sulfato de dihidroestreptomina en la inseminación artificial. Parte 11. Rev. Med. Vet. (Bs.As.).37 (3), 137.
9. Roldán, R. R. 1956. Primeros trabajos sobre congelación de semen. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 38 (2) 53.
10. Roldán, R. R. 1958. El semen congelado en la práctica diaria. Rev. Med. Vet (Bs. As.) 39 (2), 79.
11. Roldán, R. R. 1963. Desarrollo de la técnica del semen congelado y su aplicación extensiva en la Republica Argentina. Conferencia pronunciada en la Sociedad de Medicina Veterinaria (Bs. As.).
12. Roldán, R. R. 1966 b. Conservación del semen in vitro. Conservación del semen a temperaturas inferiores al punto de congelación. Actas del Symposium sobre Fisiología y Genética de la Fertilidad. CADER,13.
13. Roldán, R. R. 1966. Conservación del semen in vitro. Conservación del semen a temperaturas inferiores al punto de congelación. Actas del Symposium sobre Fisiología y Genética de la Fertilidad. CADER, 13.
14. Rowson, L.E.A. 1944. A year of artificial insemination. Veterinary Record, 56, 165.
15. Salisbury, G. W, Fuller, H. K., Willett, E. L. (1941) Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. J. Dairy Sci. 24, 05-910.
16. Salisbury, G. W, VanDemark, N.L. 1964. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial. Acribia, Zaragoza.

Volver a: [Inseminación Artificial](#)