

ANALES

DE LA

FACULTAD DE MEDICINA

TOMO XXVIII N^o 2

LIMA, SEGUNDO TRIMESTRE DE 1945

EFFECTOS DE PRESIONES BAROMETRICAS BAJAS SOBRE EL SEMEN DEL CARNERO

Por O. FERRUCCIO ACCAME **

INTRODUCCION

Durante muchos años se había observado en el Perú que tanto los animales como el hombre sufren una disminución en su fertilidad cuando son llevados a las alturas de los Andes. Se hacía responsable a la altura por estas irregularidades en la reproducción.

El autor expresa su sincero reconocimiento al Dr. J. C. Miller, Jefe Interino del Departamento de Ganadería, por su valiosa ayuda en la conducción del experimento y en la redacción de este artículo. Se hace extensivo el agradecimiento al Sr. J. A. Gray, del Departamento de Ganadería, por autorizar el uso de carneros bajo su supervigilancia; al Sr. R. W. Snyder, del Departamento de Ganadería, por facilitar el uso de una cámara frigorífica del Laboratorio de Carnes; al Sr. C. B. Godbey, del Departamento de Genética, por su ayuda en el análisis estadístico; al Dr. P. B. Pearson, del Departamento de Ganadería, por sugerencias valiosas; al Ing. Luis Monge y al Sr. J. L. Todd por su ayuda en la obtención de los datos.

Este experimento no hubiera sido posible a no ser por el equipo proporcionado gentilmente por el Departamento de Física, el Departamento de Aeronáutica y por la Estación Experimental Agrícola de Texas.

* Tesis para optar el grado de "Master of Science", en el "Agricultural and Mechanical College". Texas. EE. UU. 1944.

** Miembro del Instituto de Biología Andina de Lima, Perú. Becario del Instituto de Educación Internacional.

Hasta el presente, todos los esfuerzos para contrarrestar los efectos dañinos de la altura no se han visto coronados por el éxito. La producción de carneros y de lana es la empresa agrícola de mayor importancia en los Andes peruanos, a pesar de que el ganado criollo es muy pobre productor de carne y lana. El mejoramiento del ganado criollo por la introducción de sangre nueva se vé muy seriamente amenazado debido a la reducción de fertilidad de los machos cuando son llevados a alturas de 12,000 piés (3,660 mts.), o más. Desde que las tierras de pastoreo que se encuentran a 12,000 piés (3,660 mts.) o más son las que llevan la mayor parte de la población ovina del Perú, el mejoramiento de los lanares en la altura es un problema de considerable importancia económica.

Recientemente varios intentos de inseminar artificialmente ovejas situadas de 12,000 (3,660) a 14,000 piés (4,270 mts.) de altura con semen de machos finos mantenidos a una altura de 8,000 (2,440) a 10,500 piés (3,200 mts.), han tenido solamente un éxito limitado. Se pensó que la altura pudiera tener un efecto dañino sobre los espermatozoides, determinando así estos resultados tan pobres.

La necesidad de mayor información concierne al efecto de la altura (o presión barométrica baja) sobre el semen de carnero, llevó a la investigación presentada aquí.

REVISION DE LITERATURA

EFFECTO DE CAMBIOS DE MEDIO SOBRE LA FERTILIDAD

Existe la creencia entre los ganaderos que tanto los viajes largos como cualquier otro cambio de medio afectan la fertilidad de los animales. Ellos se vuelven estériles hasta que se adaptan al nuevo ambiente. El grado de influencia depende de la especie, de la raza, del individuo y de la magnitud del cambio de medio.

Este hecho ha sido sostenido por varios autores. Koch (1933) dice que el ganado es influenciado por diferentes factores ambientales cuando es llevado de un medio a otro, indicando que los principales factores que afectan la fertilidad son suelo, humedad, temperatura, luz y alimentación. En los machos la espermatogénesis es afectada, mientras que en las hembras, lo son, el estro, la evolución, la probabilidad de fertilización, la implantación del huevo fecundo, la mortalidad intrauterina y la longitud del período de gestación. Rice (1942) señala que

los animales transportados a países extranjeros sufren una esterilidad temporal hasta adaptarse a sus nuevas condiciones de vida.

En el Perú, habían notado los hacendados que, cuando llevaban animales finos provenientes de otros países a las alturas de los Andes, dichos animales se volvían estériles. Esta pérdida de fertilidad era atribuida no solo al largo viaje y al cambio de medio, sino también a la acción de la altura. Algunos de los animales recién importados se aclimataban, restableciéndose de su infertilidad temporal. Pero otros no se recuperaban o mejoraban sólo ligeramente, es decir, no se adaptaban a la altura.

CARACTERISTICAS DE HOMBRES Y ANIMALES NATIVOS Y ADAPTADOS A LA ALTURA

La influencia de la altura sobre hombres y animales es notable. Se requiere importantes cambios fisiológicos y biológicos para que el organismo se adapte a las condiciones existentes allí, tales como presión barométrica baja y menor tensión de oxígeno. Hurtado (1932a.) en un estudio de 950 trabajadores peruanos nacidos en la altura y que trabajan a 14,890 piés (4,540 mts.), indicó que una mayor circunferencia y volumen torácicos, una alta capacidad vital, una mayor capacidad promedio de los pulmones y dilatación de los capilares pulmonares (lo último en nativos muertos y en animales), conducían a una mejor ventilación y a un mejor intercambio de los gases respiratorios. Nuevos estudios de Hurtado (1932b) en indios nativos de los Andes peruanos, evidenciaron diferencias entre su sangre y aquella considerada normal al nivel del mar. Encontró un aumento promedio del número de eritrocitos de un millón por milímetro cúbico sobre los valores normales al nivel del mar, aunque muchos nativos tuvieron un número que se encontraba dentro de los límites normales del nivel del mar. También encontró un aumento del hematocrito, pero el peso promedio de hemoglobina por centímetro cúbico fué casi el mismo que al nivel del mar, lo que indicaría que cada glóbulo rojo en la altura contiene menos hemoglobina que lo normal al nivel del mar. Hubo una correlación inversa entre el hematocrito y la concentración de hemoglobina en cada glóbulo rojo. Trabajos posteriores de Monge (1942) confirmaron los dos informes anteriores. El encontró, tanto en individuos nacidos en los Andes como en hombres adaptados, aumento en el número de glóbulos rojos, en la capacidad de la hemoglobina, en el tamaño de los eritrocitos, en la viscosidad de la sangre, en el hematocrito, en el

pH (dentro de límites normales) y en la ventilación pulmonar, así como disminución de la saturación del oxígeno arterial, de la presión alveolar del anhídrido carbónico y de la reserva alcalina.

También los animales autóctonos de las grandes alturas muestran grandes diferencias con los otros animales oriundos de pequeñas alturas. Keys (1936) informa que los animales nativos de los Andes (llama, vicuña, etc.), no poseen una gran cantidad de hemoglobina en su sangre, pero que ella tiene una gran afinidad por el oxígeno. Dill (1938) confirmó el trabajo de Keys y encontró que las llamas y vicuñas, en la altura, tenían un menor contenido de hemoglobina que otras al nivel del mar. El también opina que la sangre de estos animales tiene una mayor afinidad por el oxígeno que la de ningún otro mamífero estudiado hasta entonces. También Hall, Dill y Guzmán Barrón (1936) informaron que los animales autóctonos de los Andes poseían mayor afinidad sanguínea por el oxígeno que otros animales; mostrando pequeña variación en la saturación del oxígeno arterial con los cambios de altura a comparación del carnero, conejo y hombre.

Resumiendo, hombres y animales oriundos de la altura tienen una mayor capacidad respiratoria y una mayor capacidad sanguínea por oxígeno. Estos dos mecanismos les permiten soportar satisfactoriamente la baja tensión del oxígeno atmosférico.

CAMBIOS EN HOMBRES Y ANIMALES DE LUGARES BAJOS CUANDO SON LLEVADOS A LA ALTURA

Los animales y hombres provenientes de lugares de pequeña altura no están generalmente adaptados para soportar un cambio de medio como es el ir del nivel del mar a alturas de 10,000 piés (3,000 mts.) o más. Cuando ellos realizan este viaje, el cambio en la presión atmosférica es bastante rápido bajo las condiciones del Perú (sólo cuestión de tres a cinco horas para ir desde el nivel del mar hasta los 16,400 piés, o sea, 5,000 mts., por carretera o tren) y su organismo reacciona para adaptarse al medio ambiente. La respiración y la composición de la sangre están entre las primeras en ser afectadas. La reproducción también es afectada. Después de algún tiempo (que es bastante variable) de estar expuesto a estas condiciones el hombre o animal puede aclimatarse.

Los cambios que el organismo sufre en el proceso de reacción y adaptación a la altura, han sido estudiados bajo condiciones naturales y artificiales.

En relación con el lado animal del problema, se ha hecho varios estudios. Lintzel y Radeff (1929) encontraron un aumento en el peso del corazón, en ratas, cuando se las sometía por períodos de dos a cuatro semanas a presiones barométricas de 280 mm. Este aumento fué del 10 por ciento del peso inicial calculado, en ratas adaptadas, y del 26 por ciento, en casos agudos. Un trabajo similar fué llevado a cabo por van Liere (1936) con conejillos de Indias, encontrando que presiones de 380 a 440 mm. producían un aumento promedio en el peso del corazón del 55 por ciento. Uno de los trabajos más completos a este respecto es el realizado por Sundstroem y Michaels (1942). Ellos sometieron ratas a diferentes niveles de presión barométrica reducida, durante diferentes períodos de tiempo. Informaron que después de cuatro semanas bajo presiones de 460 mm. 360 mm. y 300 mm. hubo una disminución en el peso del cuerpo, un cociente respiratorio anormalmente alto, un aumento en el peso del corazón, aumentos en el número de eritrocitos proporcionales a las disminuciones de presión, mayor hematocrito, pérdida de peso del hígado y riñones y un notable aumento de peso de la corteza suprarrenal. Concluyeron que el aumento en peso de las cápsulas suprarrenales, era debido al importante rol que dichas glándulas desempeñan en el mecanismo de adaptación a la altura. Otros autores Langley y Clarke (1942) han hecho hincapié en la importancia de estas glándulas en la aclimatación a la altura. Ellos encontraron una hipertrofia suprarrenal en ratas, la que llegaba a un máximo dentro de los dos días cuando se les sometía continuamente a presiones barométricas equivalentes a aquella encontrada a los 20,000 piés (6,100 mts.) de altura. Monge (comunicación personal) llegó a la misma conclusión trabajando con ratas blancas. El llevó una colonia de Lima a Morococha (14,890 piés: 4,540 mts.) encontrando hipertrofia de las suprarrenales, así como también una completa cesación de la reproducción.

EFFECTOS DE LA ALTURA SOBRE LA FERTILIDAD

Como ya ha sido mencionado, la altura tiene una gran influencia sobre la fertilidad. Monge (1943) cita que en 1535 la capital del Perú hubo de ser transferida de Jauja (11,500 piés: 3,500 mts.) a Lima (450 piés: 150 mts.), debido a irregularidades en la reproducción de los animales domésticos. Los conquistadores españoles (citado por Monge, 1943) en Potosí, Bolivia (más o menos 14,000 piés: 4,270 mts.)

no pudieron reproducirse hasta 58 años después de la fundación de la ciudad.

Monge (op. cit.) dá cuenta de matrimonios fértiles al nivel del mar que se volvían estériles en la altura, y de dos hombres oriundos de lugares bajos que no producían espermatozoides al regresar de la altura al nivel del mar. Por otro lado, él demostró que la natalidad de los andinos en la altura es igual a la de la gente de lugares bajos al nivel del mar.

En los animales se encuentra una situación análoga. Ha sido indicado por I. Masías (comunicación personal) que la fertilidad del ganado ovino criollo peruano, en la altura, es de 80 a 100 por ciento, mientras que cruces entre criollos y razas mejoradas importadas, tienen una fertilidad promedio de 64 por ciento. También observa que carneros finos tenían 75 por ciento de fertilidad a los 11,500 piés (3,500 mts.), pero que a 14,750 piés (4,500 mts.), se reducía a la mitad.

Muchos son los informes sobre casos de infertilidad causada por la altura. Cutting (1936) informa que dos perros en el Tibet se volvieron estériles al ser llevados a la altura. Monge (1943) señala que se ha encontrado casos de esterilidad debida a la altura, en carneros, conejos, caballos, vacunos y gatos, al mismo tiempo que cita que G. T. Easley (datos inéditos) examinó un grupo de carneros recientemente llevados a 13,000 piés (4,000 mts.) de altura, encontrando fértiles solo un 40 por ciento de ellos. Continúa, afirmando que cuando carneros infértiles, debido a la altura, son regresados al nivel del mar, recobran su fertilidad. Monge (1942) halló que carneros aclimatados son 100 por ciento fértiles en la altura, mientras que carneros traídos del nivel del mar, tuvieron sólo 50 por ciento, de fertilidad durante el primer año. Varios intentos han sido hechos para determinar la causa de esta esterilidad. Monge y Mori Chávez (1942) encontraron que el epitelio germinativo de los testículos de gatos llevados a 14,890 piés (4,540 mts.), estaba destruído. También encontraron que en conejos la espermatogenesis había sido afectada al ser llevados a la misma altura. Sin embargo, algunos de los conejos se encontraban en un período de restablecimiento. Monge y San Martín (1942) hicieron estudios sobre dos carneros llevados del nivel del mar a una altura de 10,500 piés (3,200 mts.). Ambos animales fueron afectados por el nuevo medio; mostrando una completa azoospermia. Uno de ellos se recuperó después de un período de varias semanas, pero su deseo sexual continuó disminuído. El segundo carnero a pesar de tener una libido normal, continuó sin producir espermatozoides.

Otras investigaciones sobre este punto han sido conducidas bajo condiciones artificiales. Alders (1930) sometió un grupo de conejillos de Indias y ratones hembras, a una anoxemia artificial prolongada para estudiar el efecto de la altura sobre los genitales femeninos. No hubo ningún efecto sobre los genitales de tres conejillos de Indias y dos ratones hembras. Tampoco tuvo ningún efecto sobre la acción de hormona estrogénica sobre 59 ratones hembras castradas, ni influenció la hormona del lóbulo anterior de la pituitaria en siete ratones hembras infértiles. Loewy y Heller (1933) observaron que seis conejillas de Indias de un grupo de siete, mantenidas a presiones de 240 a 450 mm. durante dos a cuatro días, abortaron, murieron o dieron a luz prematuramente, mientras que una parió normalmente dos conejillos vivos. Esta hembra había sido mantenida durante tres días bajo 320 mm. de presión.

En el experimento llevado a cabo en California (Sundstroem y Michaels, 1942), se hicieron varias observaciones sobre el efecto de la altura sobre la reproducción. Los testículos experimentaron una notable pérdida de peso después de varias semanas de exposición a presión reducida. Estudios histológicos revelaron que la proliferación seminífera había cesado enteramente. No hubo deseo sexual y no fué posible registrar ninguna cópula. Si se sometía ratas hembras a presiones bajas, a principios de gestación, los fetos morían sin poder ser aclimatados al exterior, causando la muerte de la madre. Si la rata preñada era tratada durante la última parte de la preñez, los fetos también morían, pero eran eliminados sin consecuencias fatales para la madre. Ninguna rata preñada pudo dar a luz ninguna ratita viva después de ser sometida a presiones reducidas.

Frotis vaginales mostraron una interrupción del ciclo estral al ser expuestas a una reducción de presión. También se encontró un pequeño aumento en el peso promedio de la tiroides y una pequeña disminución en el peso promedio de la hipófisis, aunque los autores hacen la salvedad de que probablemente estos cambios fueron más aparentes que reales. Los investigadores concluyeron que todos estos disturbios del aparato reproductor y glándulas endocrinas, fueron debidos a la altura, simulada por bajas presiones barométricas.

Gordon, Tornetta y Charipper (1943) dieron a conocer que presiones de 280 a 250 mm. de mercurio (equivalentes a una altura de 25 a 28,000 piés: 7,625 a 8,540 mts.) inhibían la espermatogenesis y reducían el peso de los testículos, vesículas seminales y próstata en la rata macho. El tejido intersticial del testículo y el epitelio de las vesículas seminales y próstata se atrofiaba solo ligeramente. Encontraron cam-

bios histológicos y mayor contenido gonadotrópico en el lóbulo anterior de la pituitaria. Inyecciones diarias de gonadotropina volvían a lo normal el peso de los órganos accesorios, pero solo parcialmente el de los testículos, lo que concuerda con el hecho de que en éstos el daño estaba localizado en el epitelio germinal. Estos resultados confirman los obtenidos por Sundstroem y Michaels (1942) en cuanto se refiere a la pérdida de peso testicular y a la interrupción de la espermatogénesis.

CARACTERISTICAS NORMALES DEL SEMEN PRODUCIDO POR CARNEROS EN LA ALTURA

San Martín y Atkins (1942), estudiando los caracteres seminales de carneros en la altura, encontraron resultados muy interesantes. Su estudio fué hecho con carneros importados (esto es, carneros que no habían nacido en la altura, pero que estaban adaptados a este medio) y con hijos de carneros importados (nacidos en la altura). Encontraron una gran variación en el pH, de 5.4 a 8.5, habiendo tendencia a permanecer en el lado ácido. La concentración espermática se encontró ser de 1.2 a 3.3 millones de espermatozoides por milímetro cúbico, con una variación de 0.3 a 7.5 millones por milímetro cúbico. La proporción de espermatozoides anormales también se encontró aumentada a un 18 por ciento como promedio. Se halló una fuerte proporción de células epiteliales y leucocitos. La motilidad fué baja, estando frecuentemente entre 0 y 4 (en una escala de 0 a 5, en la que 0 representa la ausencia de motilidad y 5 el óptimo). El semen no diluído se mantuvo mótil hasta el cuarto día de ser conservado sobre los 13,000 piés (4,000 mts.) de altura; el semen diluído (dilutor de fosfatos y yema de huevo descrito por Lardy y Phillips, 1939) fué enviado de 13,100 piés (4,000 mts.) a 450 piés (150 mts.) de altura, conservando los espermatozoides su motilidad durante nueve días.

INSEMINACION ARTIFICIAL EN LA ALTURA

Monge, San Martín, Castañón y Atkins en 1942 (trabajo inédito) inseminaron un grupo de 698 ovejas que se encontraban a 13,000 piés (4,000 mts.) con semen de carnero, colectado y enviado desde 10,000 piés (3,000 mts.) de altura. Algunos de los eyaculados fueron enviados a otra hacienda situada también a 10,000 piés (3,000 mts.), don-

de se inseminó artificialmente un grupo de 149 ovejas. Obtuvieron una parición del 48.6 por ciento en el primer grupo y del 66.44 por ciento en el segundo.

En 1943, los mismos investigadores (trabajo inédito) enviaron semen desde 10,000 piés (3,000 mts.) a 14,000 piés (4,270 mts.), embalado bajo dos diferentes sistemas. Se inseminó 102 ovejas con semen enviado en tubitos de vidrio herméticamente taponados, y 99 ovejas con semen contenido en tubitos de vidrio tapados con corchos a través de los cuales se había pasado un tubo capilar para permitir en esta forma una variación gradual de la presión atmosférica durante el ascenso a 14,000 piés (4,270 mts.). Un tercer grupo de 227 ovejas fué inseminado con semen colectado a la misma altura de inseminación (14,000 piés: 4,2000 mts.). Los porcentajes de corderos nacidos fueron los siguientes: 61.76 por ciento en el primer grupo, 48.48 por ciento en el segundo y 48.89 en el tercero.

Simultáneamente se inseminó 382 ovejas en otra hacienda situada a 14,000 piés (4,270 mts.) de altura, con semen colectado en dicha hacienda. Se obtuvo un 71.73 por ciento de parición.

MATERIAL Y METODOS

DESCRIPCION DE LOS CARNEROS EMPLEADOS

Para este estudio se empleó seis carneros puros de pedigree. Dos fueron Hampshire (Nº 462 y Nº 466, ambos de 18 meses de edad), dos Rambouillet (Nº. 2571, de seis años y Nº. 4057, de dos años y medio), un Dorset Horn (59090, de dos años) y un Merino (Nº. 2065, de dos años). Todos ellos estaban en buenas condiciones y hacían bastante ejercicio. Debido a que el carnero Nº. 2571 saltaba el cerco del potrero, hubo que confinarlo a su corral. El carnero Dorset trabajaba lentamente debido a que había estado encerrado en su corral durante cierto tiempo pero se le hacía hacer ejercicio adecuado.

Todos los carneros eran encerrados en el establo durante el día y, a excepción del carnero 2571, se les soltaba a un potrero durante la noche. Además del pasto verde al que tenían acceso por la noche, se les daba una ración consistente en libra y media (690 grs.) diaria, por cabeza, de la siguiente mezcla:

Sorgo Hegari	100 lbs. (46 kgs.)
Trigo	100 " "
Maíz desgranado	100 " "
Afrecho de trigo	20 " (9 k. 200)

Además recibían diariamente, de una a una y media libra (460-690 grs.) de heno de alfalfa. El carnero 2571 recibió más heno que los demás debido a que no tenía acceso al potrero. Todos los carneros fueron enseñados a trabajar y a seguir la misma rutina para no sufrir demoras innecesarias.

EXAMENES DEL SEMEN

El estudio del semen incluyó las determinaciones siguientes: volumen, color, viscosidad, motilidad, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides anormales y pH. Se registró también la temperatura del establo y el número de intentos hechos antes de la eyaculación.

Volumen.—Fué estimado en centímetros cúbicos por comparación con volúmenes standard.

Color y viscosidad.—Se empleó una escala subjetiva para expresar cada una de estas características. Se usó tres grados para determinar el color: cremoso, lechoso y claro, siendo el cremoso el mejor. La viscosidad fué considerada espesa, semiespasa y acuosa, siendo la primera la mejor.

Motilidad.—Los siguientes grados se usaron para indicar la motilidad:

- 5 Muy activa
- 4 Activa
- 3 Movimiento progresivo regular
- 2 Lenta
- 1 Móvil, pero no progresiva
- 0 Inmóvil

Tuvo que usarse sin embargo, fracciones al evaluar la motilidad para indicar diferencias que de otras maneras hubieran pasado desapercibidas.

Concentración espermática.—El número de espermatozoides por milímetro cúbico fué determinado por medio de un hematocitómetro con una cámara Levy de recuento. El método ha sido descrito en detalle por Lambert y McKenzie (1940).

Porcentaje de espermatozoides vivos.—Se preparó láminas para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos empleándose la técnica descrita por Lasley, Easley y Mc Kenzie (1942), modificada por Lasley y Bogart (1943).

Proporción de espermatozoides anormales.—Las mismas láminas usadas para el recuento de espermatozoides vivos se emplearon para la determinación de anomalías. Los resultados se indican en número de espermatozoides anormales por mil. Las anomalías se clasificaron en dos grupos, según Salisbury, Willett y Seligman (1942). Ellos son: “anormales verdaderos”, (cabezas anormales, cuellos anormales y colas anormales, que no sean colas retorcidas, y espermatozoides sin cola) y “artificios de preparación” tales como espermatozoides sin cola, cuellos rotos y colas retorcidas que pudieran ser producidas mecánicamente durante la preparación de las láminas.

Concentración de Hidrogeniones.—Se usó un potenciómetro Beckman con electrodos de vidrio para la determinación de la concentración de iones hidrógeno.

CARACTERES TOMADOS EN CUENTA PARA LA ESTIMACION DEL EFECTO DE LA BAJA PRESION SOBRE EL SEMEN

La motilidad, el porcentaje de espermatozoides vivos, la proporción de espermatozoides anormales y el pH., fueron las características que se tomaron en cuenta para el estudio del efecto de la baja presión sobre el semen. Se pensó que si hubiera alguna influencia de la altura sobre el semen, ella podría ser descubierta mediante diferencias en las características mencionadas entre las muestras sometidas a baja presión y muestras control.

El trabajo se dividió en dos etapas. Durante la primera etapa se estudió la motilidad, el porcentaje de espermatozoides vivos y la proporción de espermatozoides anormales; y durante la segunda se tomó en consideración el pH. Los carneros Nos. 462, 466, 59090 y 2065 fueron usados para la primera parte y los carneros Nos. 2471 y 4057 para la segunda.

METODOS USADOS

Efecto de la baja presión sobre la motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y proporción de espermatozoides anormales.— Las colecciones de semen fueron hechas tres veces por semana emplean-

do el método de la vagina artificial descrito por Lambert y McKenzie (1940).

La motilidad fué determinada inmediatamente después de la colección. El color y la viscosidad fueron también determinados en el establo. Estos datos, además de la temperatura del establo, hora de la colección, agresividad del carnero, etc., fueron registrados.

Al comienzo se trajo el semen al laboratorio a la temperatura atmosférica, pero debido a que la motilidad disminuyó considerablemente durante el período transcurrido entre la colección y el comienzo de la conservación, se decidió llevar el eyaculado en un termos que contenía hielo y agua para obtener una temperatura baja constante. Los frascos, sin embargo, no fueron aislados cuando se los colocó en la botella termos y los espermatozoides sufrieron un shock por el cambio, brusco de temperatura. La motilidad era muy baja cuando se les examinó en el laboratorio. Finalmente los frasquitos con el semen fueron envueltos en papel, cubiertos con un dedal de goma y luego colocados en la botella termos. Esta técnica es similar a la descrita por Lambert y McKenzie (Op. cit.).

El examen del semen se completaba en el laboratorio. Todas las otras características a excepción del pH se estudiaban y se registraban cuidadosamente.

Algunas muestras de semen fueron estudiadas sin dilución, especialmente durante el trabajo preliminar. Las necesidades de utilizar tres muestras suficientemente grandes obligó a diluir el semen. Se usó como dilutores: solución salina fisiológica (suero fisiológico, 0.9% de NaCl.) y solución de fosfato con yema de huevo (Lardy and Phillips, 1939). El objeto de usar dos dilutores diferentes, fué para determinar si ellos influenciaban el efecto de la baja presión sobre el espermatozoide. El semen fué diluido en la proporción de tres a uno.

Una muestra de semen de cada carnero fué colocada en cada uno de dos desecadores de vidrio. La baja presión fué obtenida usando una bomba eléctrica de vacío. Los desecadores estaban provistos de un altímetro de aviación para controlar la reducción de la presión obtenida con la bomba. En uno de los desecadores, la presión fué llevada al equivalente de 12,000 piés (3,660 m.) y en el otro a 20,000 piés (6,100 m.). Una tercera muestra de semen fué mantenida bajo presión barométrica normal para que sirviera como control. Se escogió una altura de 12000 piés (3,660 m.) por que es una altura en la que se han hecho muchas observaciones por diferentes investigadores. Además, es a esta altura que se encuentra la mayor parte del área ovina peruana. De otro lado,

se quería trabajar con una altura extrema, para saber si había alguna diferencia entre los tres niveles de presión barométrica. Por esta razón la altura de 20000 pies (6100 m.) también fué empleada.

Se había pensado que si se producía algún efecto de la altura sobre el semen, ello se apreciaría mejor empleando diferentes períodos de exposición. Se usó por consiguiente, exposiciones que variaban de sólo algunos minutos hasta 17 horas. La mayoría de las observaciones, sin embargo, fueron conducidas con períodos de conservación que variaban entre ocho y doce horas.

Cuando se empleó períodos cortos de exposición, la conservación fué hecha a la temperatura de la habitación. Cuando el semen fué expuesto durante varias horas, se almacenó a una temperatura más baja. Esto fué obtenido colocando la bomba y los desecadores en uno de los cuartos frigoríficos del Laboratorio de Carnes del Departamento de Ganadería. Este cuarto se mantenía a una temperatura que variaba entre 32° a 41° F. (0° — 5° C).

Al principio los frascos que contenían el semen fueron colocados en los desecadores sin protección contra el shock por cambio de temperatura. Esto daba lugar a una considerable pérdida de motilidad. Para prevenir esto, los frascos fueron envueltos con varias dobleces de papel. Se puso cuidado en no cerrar herméticamente los frascos para permitir así los cambios de presión sobre el espermatozoide.

El semen se examinaba nuevamente al extraerse del desecador. La motilidad se registraba y se preparaban láminas para el recuento de espermatozoides vivos y anormales. Se registró también la presión empleada, la duración de la exposición y temperatura de conservación.

Efecto de la baja presión sobre la concentración de hidrogeniones.—Debido a la dificultad en la obtención de materiales, sólo unas cuantas observaciones del pH pudieron conseguirse para el estudio del efecto de la baja presión sobre el semen. Ellas fueron hechas en eyaculados colectados de los carneros Rambouillet Nos. 2571 y 4075, después de concluída la primera parte del trabajo.

La técnica seguida para la colección y transporte del semen fué similar a la empleada para las últimas colecciones hechas durante la primera parte del estudio.

Los exámenes hechos en los eyaculados obtenidos fueron solamente el de la motilidad y el del pH. La motilidad fué determinada inmediatamente después de la colección. Los eyaculados se diluyeron con la solución de Phillips en la proporción de 3 a 1 (Lardy y Phillips, 1939) y luego divididos en dos muestras. Una de ellas fué llevada a 12000

pies (3,660 mts.) por un período de 8 horas a una temperatura de 35° a 39° F. (1.5° a 4° C). Sin embargo, hubo un día en el que la temperatura dió un término medio de 56.5° F. (13.6° C) debido a algunas dificultades en el sistema de refrigeración. La otra muestra fué usada como control.

No fué posible trabajar con los tres niveles de presión barométrica como en la primera parte del trabajo, debido a la necesidad de utilizar volúmenes más grandes para las determinaciones del pH.

Las determinaciones de la concentración de hidrogeniones fueron hechas solamente antes y después de la exposición a la baja presión durante ocho y doce horas.

Se registró la motilidad, temperatura de conservación y el pH.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos mediante la exposición de semen de carnero a presión barométrica baja son presentados separadamente en las páginas siguientes.

Efectos sobre la motilidad

La primera característica empleada para el estudio del efecto de las alturas sobre el semen de carnero fué el de la motilidad del espermatozoide.

El grado de motilidad de las muestras sometidas a alturas de 20,000 y 12,000 pies (6,100 y 3,660 mts. respectivamente) fué el mismo que el de los controles sea cual fuere la duración de la exposición, el dilutor empleado o la temperatura de conservación. Estos resultados se muestran exactamente en la tabla I. Como puede notarse, las tres muestras dieron exactamente el mismo resultado en todos los casos. Ellos diferían, sin embargo, de la motilidad observada antes de la exposición a la baja presión. Esta diferencia puede ser atribuída a la duración y temperatura de conservación y a la técnica con la que se manipuló el semen.

La diferencia en el grado de motilidad después de la exposición a presión baja, entre diferentes fechas, puede ser explicada por que se empleó diferentes técnicas o diferentes dilutores. Por ejemplo, el 22 de mayo se usó el dilutor de yema de huevo-fosfato. El 24 de mayo la técnica de manipulación del semen y la duración, temperatura y presión de la exposición fueron las mismas, pero el dilutor usado

fué la solución salina fisiológica. La motilidad final presentada por las tres muestras (20,000 piés, 12,000 piés — 6100 y 3,660 m. respectivamente — y la control) fué mucho más baja en la última fecha que en la anterior. El empleo del dilutor de yema de huevo — fosfato, hacía que el espermatozoide se hiciera más resistente a condiciones poco favorables, de acuerdo con Lasley y Mayer (1944).

La diferencia entre la motilidad de muestras de diferentes carneros, sometidas al mismo tratamiento en una fecha determinada, puede ser explicada por la diferencia individual de los carneros que producían el semen.

Efectos sobre el porcentaje de espermatozoides vivos

El porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó después del período de conservación, en las muestras sometidas a la altura y en el grupo control, comparado con el recuento hecho inmediatamente antes del tratamiento por altura.

El porcentaje de espermatozoides vivos fué, sin embargo, muy similar en las muestras tratadas y las de control de los cuatro carneros, como se ve en las figuras, 1, 2, 3 y 4.

Las técnicas diversas de manipulación del semen, dilutores, acción y temperatura de exposición no influenciaron la acción de la baja presión sobre el porcentaje de espermatozoides vivos desde que los resultados obtenidos enseñan que las muestras sometidas a la exposición y las de control tenían porcentaje similares de espermatozoides vivos después de tratamiento bajo toda clase de condiciones.

Se hizo un análisis de variación para ver si había alguna diferencia significativa entre el grupo control y las muestras sometidas a tratamiento. El cuadro II muestra los resultados de la comparación entre el grupo control y las muestras llevadas a 20000 piés (6100 mts.). Análisis similares se hicieron para comparar el grupo control con las muestras llevadas a 12000 piés (3660 mts.) y las muestras de 12000 piés (3,660 mts.) con las de 20000 piés (6100 mts.).

Se encontró que no hay diferencia significativa entre el grupo control y las muestras tratadas (baja presión) del mismo carnero. Hubo una diferencia altamente significativa entre las muestras obtenidas del mismo carnero en diferentes días, lo cual se explica por las diferentes técnicas, dilutores y duraciones de exposición a baja presión empleados. Se encontró también una diferencia altamente significativa entre los dis-

-15-

CUADRO I

EFFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE PRESION BAROMETRICA BAJA Y TIEMPO DE EXPOSICION SOBRE LA MOTILIDAD DE SEMEN DILUIDO DE CARNERO.

FECHA	CARNERO N°	DILUTOR USADO	TEMPERATURA DE EXPOSICION °C	DURACION DE LA EXPOSICION (HORAS)	MOTILIDAD				
					ESTABLO NO DILUIDO	DILUIDO INICIAL	20,000 PIES 6,100 MTS.	12,000 PIES 3,660 MTS.	CONTROL
4-7	466	NaCl	t°habitación	1:30	5	1	2	1	3
	466				5	1	1	1	1
	59090				5	1	1	1	1
	2065				4	1	1	1	1
4-11	462	NaCl	t°habitación	2:30	5	3	2	3	2
	466				5	3	3	3	3
	59090				5	3	3	3	2
	2065				4	2	2	2	2
4-18	462	NaCl	t°habitación	1:30	5	2	2	2	2
	466				5	4	3	4	4
	59090				5	4	4	5	4
	2065				5	2	2	2	2
4-19	462	NaCl	t°habitación	1:30	5	4	3	4	3
	466				5	3	3	4	4
	59090				5	2	3	2	2
4-21	462	NaCl	2.8-5°	16:30	5	5	0	0	0
	466				5	5	1	1	1
	59090				5	5	2	2	2
	2065				5	5	1	1	1
4-25	462	NaCl	3.9-4.4°	4:00	5	5	3	4	3
	466				5	4	2	3	2
	59090				5	5	3	4	3
	2065				5	2	2	2	2
4-26	462	NaCl		4:00	5	2	2	2	2
	466				5	2	3	2	2
	59090				5	1	1	1	1
	2065				5	1	1/2	1/2	1/2
4-28	462	NaCl		17:00	5	5	1/2	1	1/2
	466				5	5	1	1	1/2
	59090				5	3	3	2	1
	2065				5	4	2	1	1

-16-

CUADRO I
(Continuación)

FECHA	CARNERO Nº	DILUTOR USADO	TEMPERATURA DE EXPOSICION °C	DURACION DE LA EXPOSICION (HORAS)	MOTILIDAD				
					ESTABLO NO DILUIDO	DILUIDO INICIAL	20,000 PIES 6,100 MTS.	12,000 PIES 3,660 MTS.	CONTROL
5-3	462	Phillips	1°7-2°8	8:00	5	5	3	3	3
	466				5	5	3	3	3
	59090				5	3	3	3	3
5-5	462	Phillips	3°3-1°7	8:00	5	4	2	2	2
	466				5	5	3	2	2
	59090				5	5	3	3	3
5-6	462	Phillips	1°7-0	8:00	5	5	3	3	3
	466				5	4	2	2	2
	59090				5	3	3	3	3
	2065				5	5	2	2	2
5-8	462	NaCl	2°8-1°1	8:00	5	5	1	1	1
	466				5	3	2	2	1
	59090				5	4	1	1	-
5-15	462	NaCl	2°8-1°7	12:00	5	5	1/2	0	1/2
	466				5	5	1	1	1
	59090				5	5	0	0	0
	2065				5	5	1	1	1
5-17	462	Phillips	0°5-0°5	12:00	5	5	4	4	3
	466				4	4	3	3	3
	59090				5	5	4	4	4
5-19	466	Phillips	3°3-4°4	12:00	5	5	3	3	3
	466				5	5	3	4	4
5-22	462	Phillips	1°1-0	12:00	5	5	3	3	3
	466				5	5	3	3	3
	59090				5	5	4	4	4
	2065				5	5	4	4	4
5-24	462	NaCl	0°5-0	12:00	5	5	1/2	1/2	1/2
	466				5	5	1	1	1
	2065				5	4	1/2	1/2	1/2

* NaCl = solución salina fisiológica

** Phillips = dilutor fosfatos yemo de huevo

tintos carneros. Esta variación fué debida a los factores individuales de cada carnero, aunque también parte de ella, puede haberse debido a las diferentes técnicas usadas en los días de observación.

Como no existieron diferencias significativas entre los controles y las muestras tratadas, el estudio estadístico entre las cuentas inicial y final de espermatozoides vivos se limitó a un sólo análisis de variación entre los recuentos de las muestras inicial y control. La distribución de los datos se hizo en forma análoga a la usada en el cuadro II. Entre las dos cuentas se encontró una diferencia altamente significativa.

EFECTO SOBRE LA PROPORCION DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES

La proporción de espermatozoides anormales verdaderos y la proporción total de espermatozoides anormales se dá en el cuadro III. Ellos fueron estudiados estadísticamente por medio del análisis de variación.

No se encontró diferencia significativa entre la proporción de espermatozoides anormales verdaderos del control y de las muestras tratadas. El recuento de espermatozoides anormales verdaderos hechos antes de la exposición a la baja presión, no difirió significativamente del de las muestras tratadas. Resultados similares fueron obtenidos en el análisis de variación de la proporción total de espermatozoides anormales.

Efecto sobre la concentración hidrogeniónica

Se hizo muy pocas determinaciones de pH, como se desprende del cuadro IV.

El análisis de variación demostró que no hubo diferencia significativa entre el control y la muestra sometida a la baja presión pero que la diferencia entre ambas y el pH inicial era altamente significativa.

Discusión

Los resultados presentados en este trabajo concuerdan con aquellos obtenidos en 1943 por el Instituto Nacional de Biología Andina del Perú. Esta institución obtuvo un parición casi tan alta, inseminando ovejás a 14000 piés (4270 mts.) con semen enviado desde 10000 piés (3000

CUADRO III

EFEECTO DE DIFERENTES NIVELES DE PRESION BAROMETRICA REDUCIDA SOBRE EL CONTENIDO DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES VERDADEROS Y TOTAL DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES EN EL SEMEN DE CARNERO.

CARNERO Nº	ESPERMATOZOIDES ANORMALES VERDADEROS POR 1,000				TOTAL DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES POR 1,000			
	INICIAL	20,000 PS. 6,100 MTS	12,000 PS. 3,660 MTS	CONTROL	INICIAL	20,000 PS. 6,100 MTS	12,000 PS. 3,660 MTS	CONTROL
462	15	3	18	6	45	57	72	63
	3	3	0	9	60	39	72	60
	3	-	0	0	21	-	9	3
466	3	0	-	0	39	48		90
	21	30	48	78	174	268	233	294
	81	102	93	30	249	372	306	207
59090	9	3	3	0	51	60	75	54
	6	0	-	0	24	15	-	15
	0	0	3	0	0	3	15	12
2065	21	6	18	17	96	156	126	146
	6	-	0	0	156		144	111

mts.), como la conseguida, inseminando a 14,000 piés (4,270 mts.) con semen colectado a esta misma altura. Ambos trabajos sugieren que la presión reducida, actuando directamente sobre el semen, no lo afecta y que la disminución de la fertilidad en animales llevados a la altura puede ser debida a una menor cantidad de oxígeno suministrada a las gónadas a través de la sangre.

Para hacer más completo el estudio de la acción de la altura sobre el semen de carnero, se intentó probar la capacidad fertilizadora de éste, después de ser sometida a presiones barométricas reducidas. Desgraciadamente, esta investigación hubo de iniciarse fuera de la época normal de monta de los carneros, y por consiguiente, no se pudo obtener un número de ovejas en estro, suficiente para continuar este estudio.

CUADRO IV

EFFECTO DE PRESIONES BAROMETRICAS BAJAS SOBRE LA CONCENTRACION DE IONES HIDROGENO EN EL SEMEN DE CARNERO. *

CARNERO N° 2571			CARNERO N° 4075		
Inicial	12,000 pies 3,660Mts.	Control	Inicial	12,000 pies 3,660Mts.	Control
7.0	6.5	6.45	6.6	6.5	6.55
6.9	6.55	8.85	6.7	6.6	6.6
6.5	6.5	6.45	6.5	6.45	-
6.75	6.6	6.55	6.75	6.75	6.5
6.8	6.5	6.5	6.6	6.55	6.5

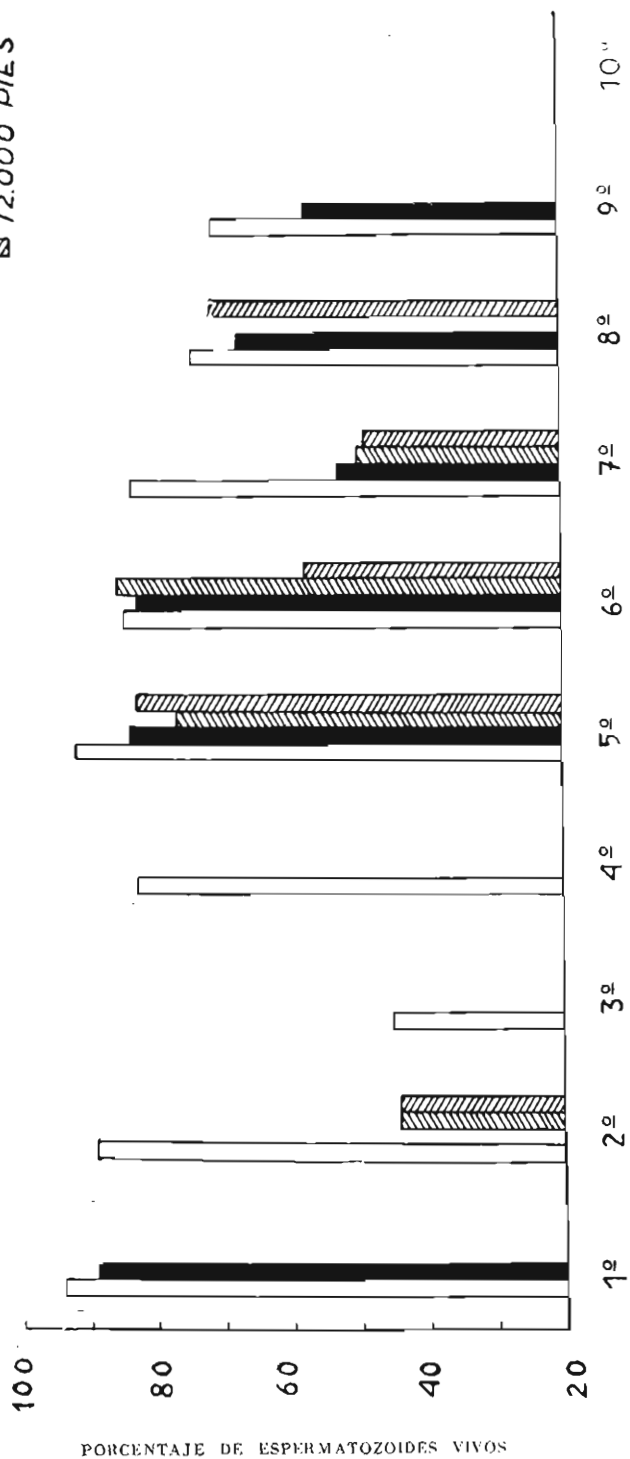
* Todas las muestras fueron expuestas durante 8 horas, a excepción de la última, la que fué tratada durante 12 horas.

El hecho de que el semen no fué afectado por presiones barométricas reducidas indicaría que los espermatozoides pueden soportar estos cambios de presión. Parece ser que la respiración anaerobia del espermatozoide sea uno de los factores responsables de esta resistencia.

Futuras investigaciones podrían demostrar que la disminución de la fertilidad es producida por la baja tensión de oxígeno actuando sobre el organismo en diferentes maneras, siendo la más probable mediante su acción sobre las gonadas. Esto se vé reforzado por los estudios de San Martín y Atkins (1942), quienes encontraron diferencias entre el semen de carnero producido en la altura y al nivel del mar, lo cual indicaría que los testículos son afectados por la presión barométrica baja. Más aún, ha sido dado a conocer por diferentes autores que la altura causa destrucción de los epitelios germinales, y cesación de la espermatogenesis (Monge y Mori Chávez, 1942; Monge y San Martín, 1942; Sundstroem y Michaels, 1942, y Gordon et al., 1943).

Se necesita nuevas y más amplias investigaciones en este campo, especialmente respecto a la influencia de presiones reducidas sobre la capacidad fecundadora del semen.

- INICIAL
- CONTROL
- ▨ 20.000 PIES
- ▩ 12.000 PIES



OBSERVACIONES

Figura v.—Efecto de diferentes niveles de presión barométrica baja sobre el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen del carnero N.º 466.

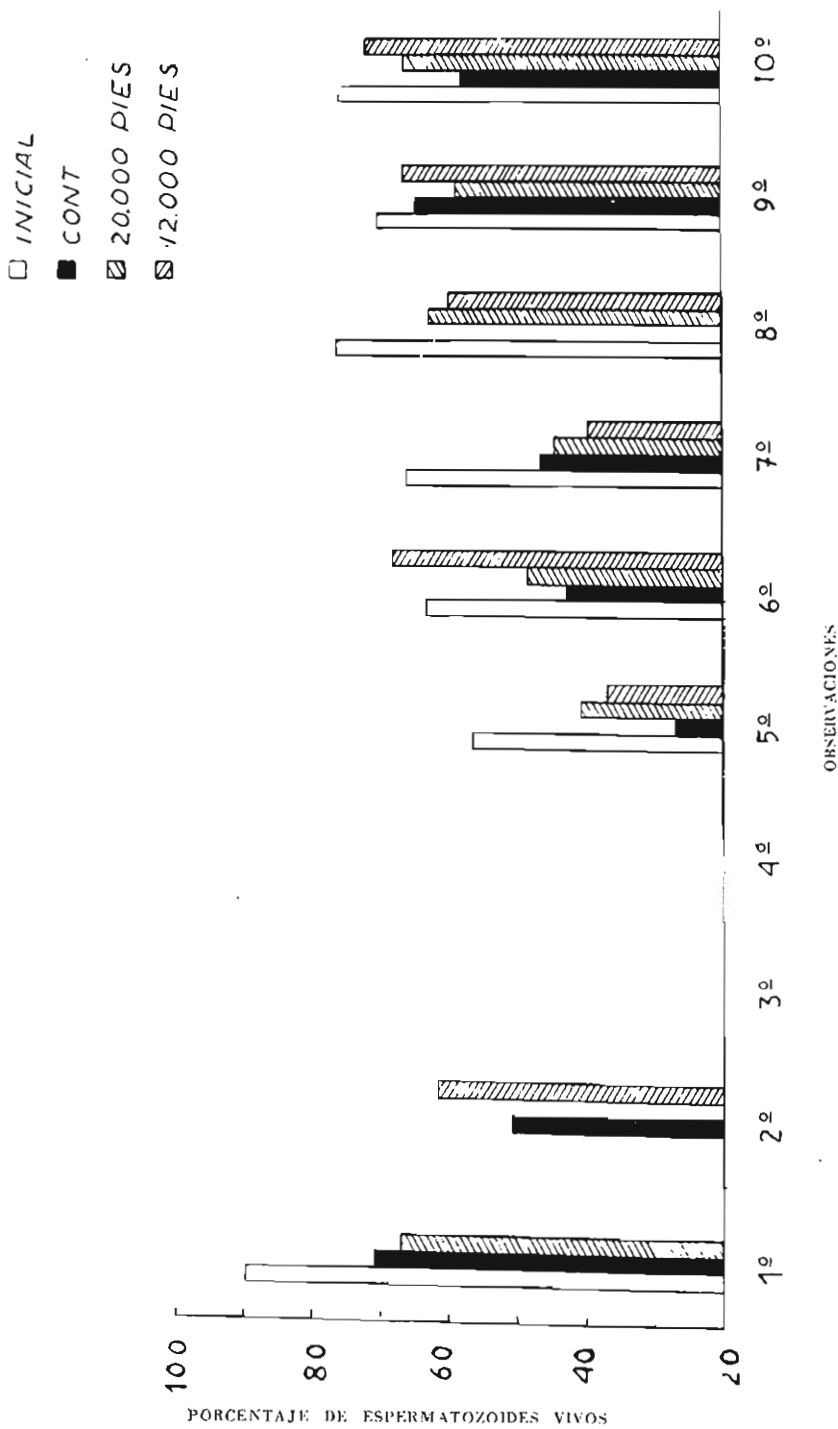
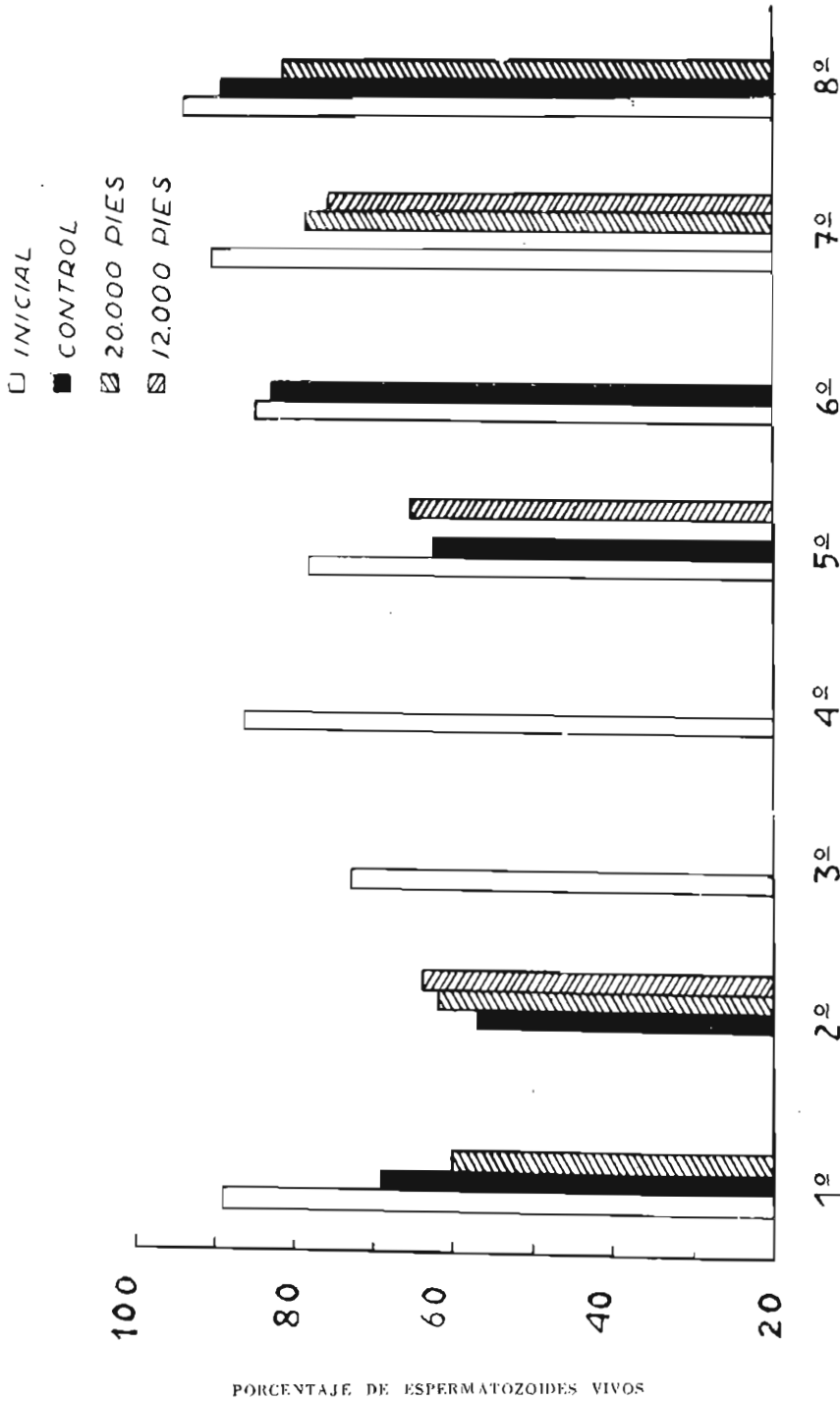


Figura v.—Ejeto de diferentes niveles de presión barométrica baja sobre el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen del carnero N.º 462.



OBSERVACIONES
Figura 3.—Efecto de diferentes niveles de presión barométrica baja sobre el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen del carnero N.º. 59090.

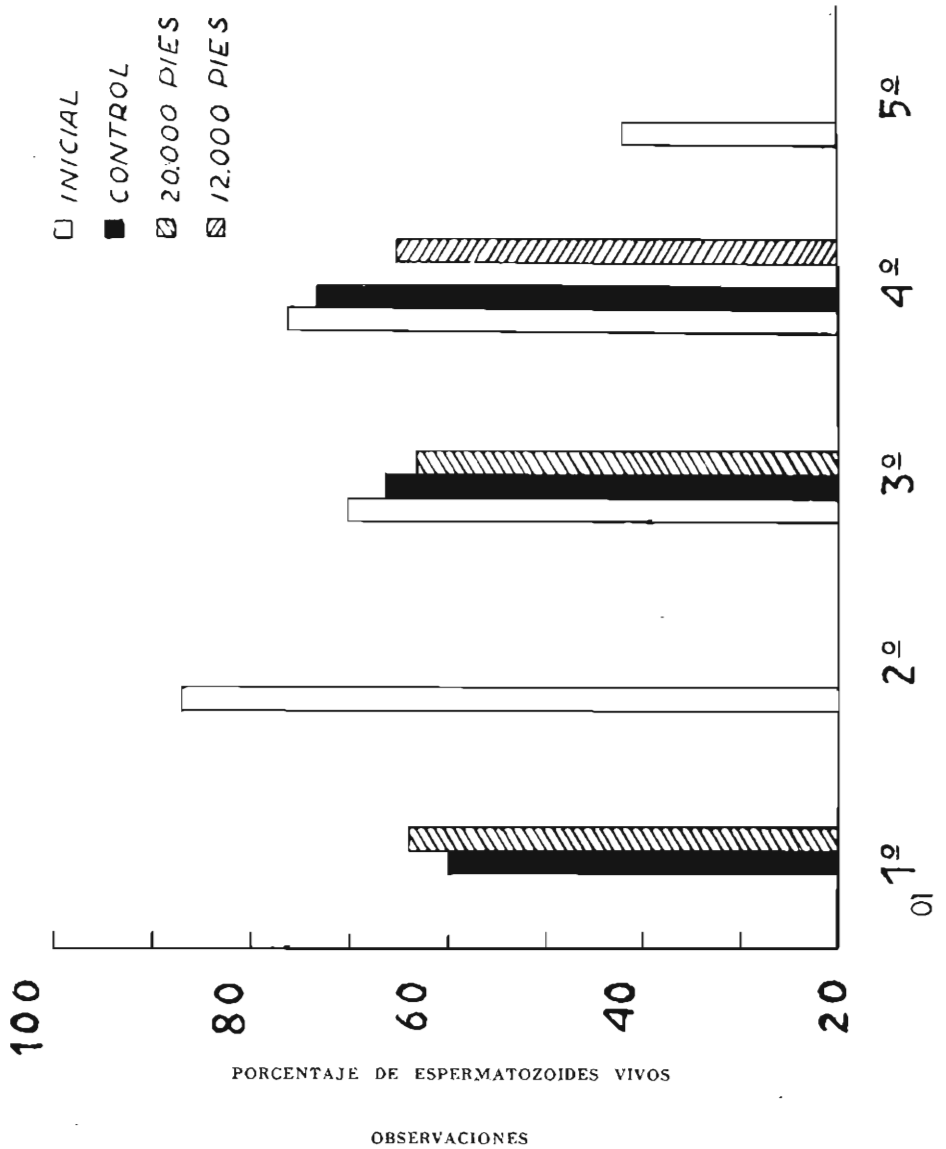


Figura 4.—Efecto de diferentes niveles de presión barométrica baja sobre el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen del carnero N^o. 2065.

SUMARIO Y CONCLUSIONES

- 1.—Se cita literatura demostrando que presiones barométricas reducidas, producen una cesación de la espermatogenesis en animales fértiles llevados a la altura.
- 2.—No existían datos sobre el efecto de cambios de presión sobre el semen cuando éste es enviado de una altura a otra mayor.
- 3.—Se usó seis carneros (dos Hampshire, dos Rambouillet, un Merino y un Dorset Horn) para estudiar el efecto de presiones barométricas bajas sobre el semen expuesto a ellas, durante diferentes períodos de tiempo.
- 4.—El semen fué sometido a presiones equivalentes a 12,000 (3,660) y 20,000 piés (6,100 mts.) de altura durante períodos que variaron desde algunos minutos hasta 17 horas.
- 5.—La motilidad no fué afectada por la baja presión barométrica.
- 6.—La altura no tuvo ningún efecto sobre la proporción de espermatozoides anormales en el semen.
- 7.—El porcentaje de espermatozoides vivos no fué influenciado por presiones barométricas reducidas.
- 8.—La concentración de iones hidrógeno no fué afectada por las presiones bajas.
- 9.—De acuerdo con los resultados obtenidos, el semen de carnero no fué afectado por la altura.
- 10.—Se necesita más investigaciones, particularmente sobre la capacidad fertilizante del semen sometido a presión barométrica reducida.

BIBLIOGRAFIA

- Alders, Nicolaus.* 1930. Über die morphologische und funktionelle Resistenz der weiblichen Genitalien von Nagetieren gegen Luftmangel. *Zeitschr. Geburtsh. u. Gynakol.* 97:194—199.
- Cutting, C. S.* 1936. In Lhasa, the forbidden. *Jour Nat. Hist.* 37:103.
- Dill, D. B.* 1938. Life, heat and altitude. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.
- Gordon, A. S., Tornetta, F. J., and Charipper, H. A.* 1943. Effect of low atmospheric pressures on reproductive system of the male rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N. Y.)* 53:6-7.
- Hall, F. G., Dill, D. B., and Guzmán Barrón, E. S.* 1936. Comparative physiology in high altitudes. *Jour. Cell. and Comp. Physiol.* 8:301-513.
- Hurtado, Alberto.* 1932a. Respiratory adaptation in the Indian natives of the Peruvian Andes. *Studies at high altitude. Amer. Jour. Phys. Anthropol.* 17:137-165.
- Hurtado, Alberto.* 1932b. Blood observations of the Indian natives of the Peruvian Andes. *Amer. Jour. Physiol.* 100: 487-505.

- Keys, A.* 1936. Physiology of life at high altitudes. International high altitude expedition to Chile. Sci. Mo. N43:289-312.
- Koch, W.* 1933. Die Fruchtbarkeit der Haustiere und ihre Beeinflussung durch die Umwelt. Zuchtungskunde 8:87—97.
- Lambert, W. V., and McKenzie, F. F.* 1940. Artificial insemination in livestock breeding. U. S. D. A. Circ. 567.
- Langley, L. L., and Clarke, R. W.* 1942. The reaction of the adrenal cortex to low atmospheric pressure. Yale Jour Biol. Med. 14:529-548.
- Lardy, H. A., and Phillips, P. H.* 1939. Preservation of spermatozoa. Proc. Am. Soc. Anim. Prod. 32:219-221.
- Lasley, J. F. and Bogart, Ralph.* 1943. Some factors influencing reproductive efficiency of range cattle under artificial and natural breeding conditions. No. Agr. Expt. Sta. Res. Bul. 376.
- Lasley, J. F., Easley, G. T. and McKenzie, F. F.* 1942. A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa. Anat. Rec. 82:167-174.
- Lasley, J. F., and Mayer, D. T.* 1944. A variable physiological factor necessary for the survival of bull spermatozoa. Jour. Anim. Sci. 3:129-135.
- Van Liere, E. J.* 1936. The effect of prolonged anoxemia on the heart and spleen in the mammal. Jour. Physiol. 116:290-294.
- Lintzel, W. un Radelf, T.* 1939. Über die Wirkung der Luftverdunnung auf Tiere. 1. Mitteilung. Heamoglobingehalt, Erythrocytenzahl, Herzgewich. Pflugers Arch. f. d. Ges. Phys. d. Mensch. u. d. Tiere 222-674-689.
- Loewy, A. und Heller, R.* 1933. Erythrocytenzahl und Haemoglobingehalt bei unter starker Luftverdunnung geborene Meerschweinchen, Zeitschr. Ges. Exp. Med. 87:33-37.
- Monge, Carlos.* 1942. Life in the Andes and chronic mountain sickness. Science 95:79-81.
- Monge, Carlos.* 1943. Chronic mountain sickness. Physiol. Rev. 23:166-184.
- Monge M., Carlos y Mori Chávez, P.* 1942. Fisiología de la reproducción en la altura. La espermatogénesis en la altura. An. Fac. Cien. Med. (Lima). 25:34-40.
- Monge M., C. y San Martín, M.* 1942. Nota sobre azoospermia de carneros recién llegados a la altura. An. Fac. Cien. Med. (Lima) 25:58-62..
- Rice, V. A.* 1942. Breeding and improvement of farm animals. 3d. ed. Mc Graw-Hill Book Co., Inc. N. Y.
- Salisbury, G. W., Willett, E. L. and Seligman, Jack.* 1942. The effect of the method of making semen smears upon the number of morphologically abnormal spermatozoa. Jour. Anim. Sci. 1:199-205.
- San Martín, Mauricio y Atkins, Jorge.* 1942. Estudios sobre la fertilidad del ganado lanar en la altura. An. Fac. Cien. Cien. Med. (Lima), 25:41-54.
- Snedecor, C. W.* 1940. Statistical Methods. 3d. ed. Iowa State Coll. Press. Ames, Iowa.
- Sundstroem, E. S. and Michaels, G.* 1942. The adrenal cortex in adaptation to climate, altitude and cancer. Univ. Calif. Memoir, v. 12.