

VALORACION DE LA DOSIS EFECTIVA MEDIA Y SENSIBILIDAD ESTACIONAL EN EL BUFO SPINULOSUS, USANDO STANDARD INTERNACIONAL DE GONADOTROFINA CORIONICA

Dr. WASHINGTON RODRIGUEZ GUTIERREZ

Trabajo realizado en el Departamento de Endocrinología, Ginecología y Esterilidad,
Hospital A. Loayza — Lima - Perú

La expulsión de espermatozoides producida por gonadotrofinas hipofisarias en los batracios, descrita por Haussay y asociados (1, 2), sirvió de fundamento para su aplicación por primera vez en el diagnóstico biológico del embarazo humano por Galli Mainini (5, 6), usando el *Bufo arenarum*. Desde entonces es conocida por todos el uso universal de esta prueba diagnóstica, utilizando batracios machos de los géneros *Bufo* y *Rana*. En Sud América y particularmente en nuestro país, el uso del *Bufo* o sapo común se ha generalizado, por las ventajas que ofrece en cuanto a la simplicidad de la prueba unida a su buena especificidad, facilidad en la obtención del animal y economía.

Aprovechando esta reacción se ha ensayado la determinación cuantitativa de la gonadotrofina coriónica, a pesar de las limitaciones impuestas por la serie de factores que alternan la efectividad de las respuestas, como la estación del año en que se emplean los animales (10, 11, 15, 18, 19), el peso de estos (4), la temperatura ambiente (7, 9), o la dosis (4, 7, 8, 9, 11), entre otros. También a modo de simple información recordamos las descripciones hechas sobre la liberación de espermatozoides conseguida por otras sustancias, como las inyecciones de oxalatos (12, 22).

Nuestra intención fue tratar de establecer el comportamiento de la sensibilidad del *Bufo spinulosus* macho o sapo común con el que se trabaja en Lima, a la acción espermiante de la gonadotrofina coriónica, en las diferentes estaciones y durante un año.

Procurando ordenar los resultados en función de un patrón de medida, nos propusimos valorar el efecto de la dosis inyectada, por la denominada "dosis efectiva", capaz de expresar con óptima uniformidad las diversas respuestas positivas por conseguirse en el batracio. En todo esto, nos animaba el propósito de facilitar en nuestro medio, la cuantificación de la gonadotrofina coriónica en cualquier época del año, usando el *Bufo spinulosus*.

MATERIAL Y METODOS

En nuestras experiencias se usaron 369 sapos machos *Bufo spinulosus* var. *Limensis* y var. *Wyra*, de peso adecuado entre 75 y 125 g. y sexualmente maduros. Los animales habían sido capturados recientemente o estuvieron en cautiverio por un tiempo menor de dos semanas antes del experimento y siempre fueron mantenidos a temperatura ambiente.

Hemos podido disponer del standard internacional de la gonadotropina coriónica, gentilmente proporcionado por el National Institute of Medical Research, Mill Hill de Londres. La gonadotropina se disolvió en solución fisiológica de cloruro de sodio, inyectando la dosis elegida en un volumen de 2 ml. y en el espacio linfático dorso-caudal. Las dosis se eligieron mediante ensayos previos. Los lotes de animales fueron inyectados —según los casos— con 2.5, 6, 8, 10, 15, 20, 30, y 50 U.I. por sapo.

Las respuestas en la orina cloacal de cada animal, se realizaron con lecturas a la 1ª, 2ª, 3ª, 6ª y 24 horas. Se consideró una respuesta positiva, cuando había desprendimiento de espermatozoides, comprobado bajo observación microscópica.

Estos experimentos se realizaron de julio de 1961 a junio de 1962, abarcando así las cuatro estaciones del año.

R E S U L T A D O S

En el Cuadro N° 1, se observan los resultados obtenidos. En la 1ª columna se indica la estación del año, con la media de la temperatura ambiente a la sombra que calculamos en base a las observaciones mensuales en Lima, proporcionadas por el Servicio de Agrometeorología e Hidrología del Ministerio de Agricultura. En la 2ª columna vemos las unidades internacionales de gonadotropina coriónica standard por dosis inyectada a cada sapo. La 3ª columna da los logaritmos correspondientes a las unidades inyectadas. Luego en cuatro columnas se consignan las respuestas positivas con las lecturas horarias realizadas; los resultados se expresan en números quebrados, representando el denominador la cantidad de sapos empleados y el numerador las respuestas positivas obtenidas; la simple observación deja ver el acmé de positividad se presenta en la 2da. y 3ra. hora, para luego disminuir según la cuantía de la dosis inyectada. Finalmente, en la última columna se expresa el porcentaje de respuestas positivas para cada dosis, con su error standard.

La variación estacional de la sensibilidad animal a la gonadotropina coriónica, nos ha sugerido relacionar la dosis inyectada con el porcentaje de respuestas positivas para ordenar y obtener una medida de la dosis efectiva media correspondiente a cada estación. Con tal fin, hemos construido un dia-

C U A D R O N ° 1

RESULTADOS OBTENIDOS CON LA INYECCION DE STANDARD INTERNACIONAL DE GONADOTROFINA CORIONICA EN EL SAPO MACHO "BUFO SPINULOSUS".

ESTACION DEL AÑO		Dosis U.I.	Log. dosis	RESPUESTAS POSITIVAS				% de positividad ± E.S.	
Temperatura media	1 ^o h.			2 ^o - 3 ^o hs.	6 ^o h.	24 hs.			
INVIERNO Jul.-Set. M: 15. 7° C	8	0.903	2/10	2/10	1/10	0/10	20	± 12.65	
	10	1.000	6/20	7/20	5/20	1/20	35	± 10.66	
	15	1.176	10/20	12/20	5/20	2/20	60	± 10.95	
	20	1.301	7/10	8/10	6/10	5/10	80	± 12.65	
	30	1.477	10/10	10/10	9/10	6/10	100	± 3.16	
	50	1.699	9/10	10/10	10/10	7/10	100	± 3.16	
PRIMAVERA Oct.-Dic. M: 18.7°C	2.5	0.389	0/5	0/5	0/5	0/5	0	± 0	
	6	0.778	4/20	6/20	3/20	0/20	30	± 10.25	
	8	0.903	7/20	8/20	5/20	1/20	40	± 10.95	
	10	1.000	10/20	12/20	9/20	2/20	60	± 10.95	
	15	1.176	16/20	16/20	12/20	5/20	80	± 8.94	
	20	1.301	9/10	9/10	8/10	4/10	90	± 9.49	
VERANO Ene.-Mar. M: 23°C	30	1.477	10/10	10/10	9/10	7/10	100	± 3.16	
	50	1.699	8/10	10/10	9/10	7/10	100	± 3.16	
	8	0.903	2/10	2/10	0/10	0/10	20	± 12.65	
	10	1.000	6/20	6/20	4/20	0/20	30	± 10.25	
	15	1.176	11/20	11/20	3/20	1/20	55	± 11.12	
	20	1.301	7/10	7/10	5/10	3/10	70	± 14.49	
OTOÑO Abr.-Jun. M: 19°C	30	1.477	8/10	9/10	7/10	5/10	90	± 9.49	
	50	1.699	10/10	10/10	8/10	6/10	100	± 3.16	
	8	0.903	2/20	3/20	1/20	0/20	15	± 7.98	
	10	1.000	4/20	5/20	2/20	0/20	25	± 9.68	
	15	1.176	11/20	11/20	8/20	3/20	55	± 11.12	
	20	1.301	9/14	9/14	7/14	4/14	64	± 12.83	
30	1.477	8/10	8/10	6/10	5/10	80	± 12.65		
50	1.699	10/10	10/10	7/10	5/10	100	± 3.16		

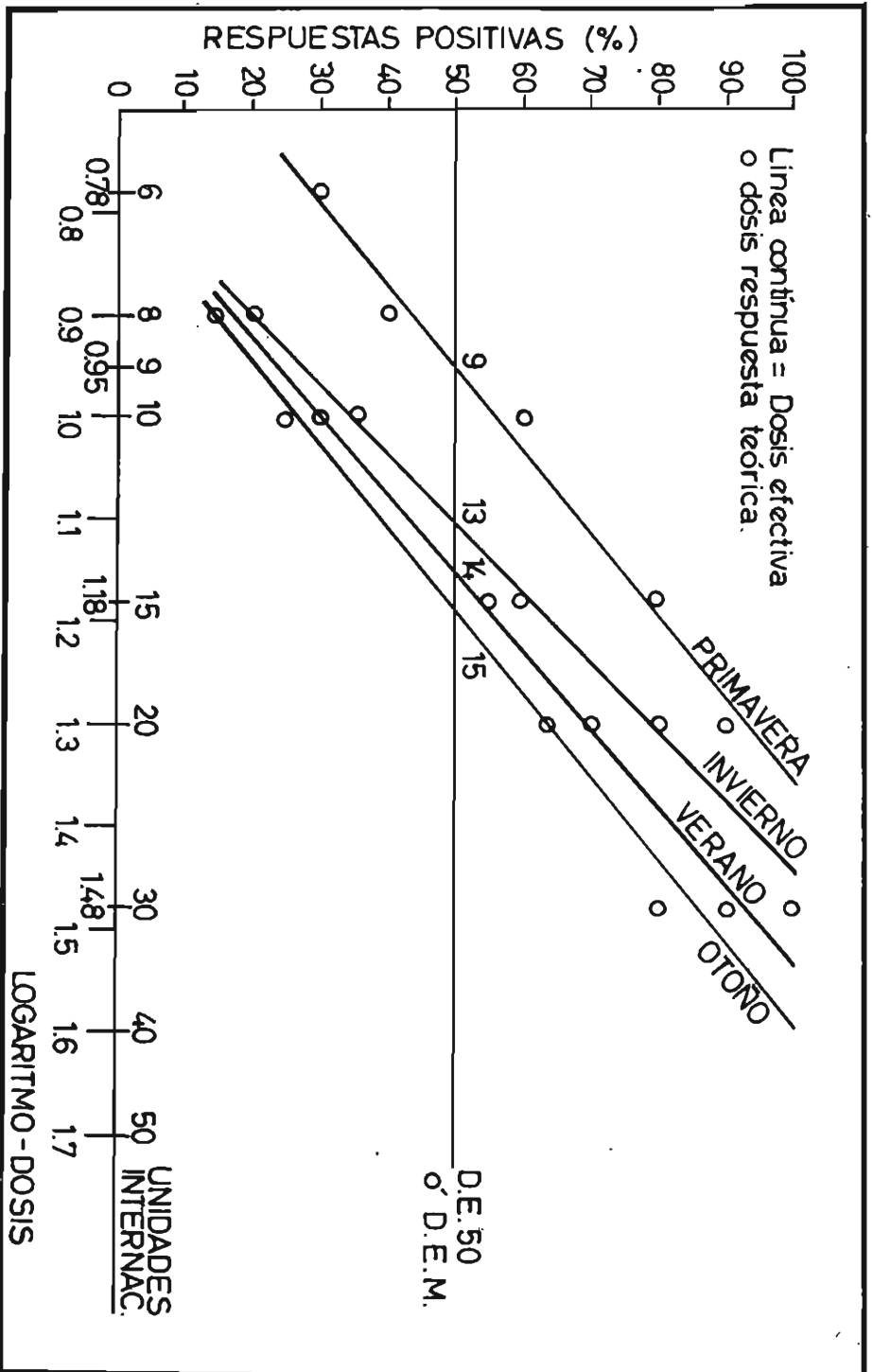


Figura Nº 1.— Variación estacional de la dosis efectiva. Relación entre los logaritmos de las U.I. inyectadas de gonadotrofina confertica y el porcentaje de respuestas positivas.

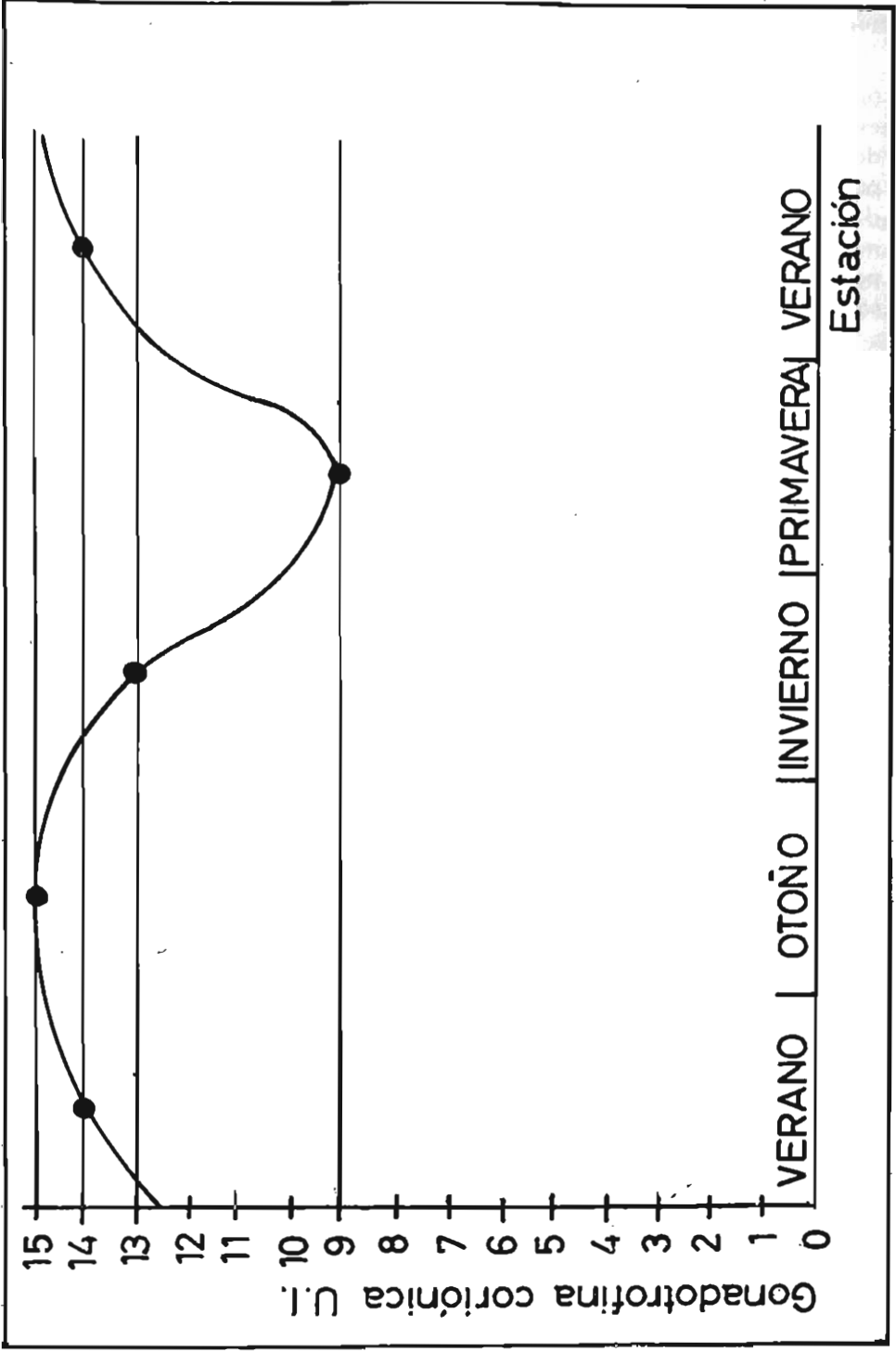


FIGURA N° 2.— Curva de la D.E. 50, según la estación del año.

grama con escala semi-logarítmica que se representa en la Figura N° 1, poniendo en la abscisa los logaritmos de las unidades internacionales de gonadotropina coriónica inyectada y en la ordenada el por ciento de respuestas positivas a escala aritmética. Uniendo con una línea los puntos equidistantes del porcentaje de respuestas positivas halladas en nuestros experimentos, hemos obtenido cuatro curvas correspondientes a las dosis-respuestas teóricas, para cada estación, que representan el valor de la dosis efectiva (D.E.) para cada porcentaje de respuestas positivas.

Según es habitual en valoraciones cuantitativas y tratando de uniformar nuestros hallazgos con los descritos en la literatura, hemos optado el criterio, siguiendo a Trevan (21), de valorar el efecto de la dosis inyectada, por la "dosis efectiva 50 por ciento (D.E. 50) ó dosis efectiva media (D.E.M.)", referible en nuestro caso a la dosis necesaria para producir liberación de espermatozoides o respuestas positivas en el 50% de animales inyectados con gonadotropina coriónica. Según esto, la D.E. 50 teórica para el *Bufo spinulosus*, presentó fluctuaciones entre 9 y 15 U.I. según la estación; la sensibilidad resultó mayor en primavera con 9 U.I. y mínima en otoño con 15 U.I., quedando entre ambas las respuestas de 13 U.I. y 14 U.I. para el invierno y verano respectivamente (Figura N° 2).

DISCUSION

El análisis de los resultados, indica la observación ampliamente significativa que también el sapo macho común de Lima (*Bufo spinulosus*), al igual que otras especies de batracios de diversos países, presenta —según la estación del año— modificaciones en la sensibilidad a las respuestas espermiantes por acción de la gonadotropina coriónica, coincidiendo la máxima sensibilidad de primavera con la época del celo del animal.

Es de la mayor importancia establecer comparaciones con los informes reportados por otros autores, que también usaron en sus trabajos standard internacional de gonadotropina coriónica; así, para el *Bufo arenarum* la D.E. 50 fijaron, Houssay (3) en 22.5 U.I. Penhos (11) de 21.1 a 32.3 U.I. y del Campo Hachen (14) 22.5 a 30 U.I.; en tanto para el *Bufo americanus* Hon (15) halló una D.E. 100 entre 12 a 45 U.I.; y nosotros, en el *Bufo spinulosus* obtuvimos una D.E. 50 variable de 9 a 15 U.I. A modo de simple información citamos, otros, usando gonadotropina coriónica humana pero comercial, obtuvieron los siguientes valores, en *Rana pipiens* Hartmann (10) D.E.50 = 9.6 U.I., Haskins y Sherman (20) D.E.75 = 35 U.I.; en el *Bufo arenarum* Schweitzer y Bas (13) D.E.66 = 38 U.I., según Galli Mainini (7, 9) 40 U.I., y para

Moisset de Espanes (24) D.E.60 = 25 U.I.; por último, en nuestro Bufo spinulosus hallaron San Martín (16) D.E.85.7 = 10 U.I. y Roe (17) D.E.50 = 31-36 U.I.

La simple observación entre la diferencia de nuestros resultados y los dados por otros autores que también usaron el standard internacional, indica una mayor sensibilidad mostrada por nuestro Bufo común, sobre los otros ejemplares del Continente. A su vez este batracio resulta con una sensibilidad comparable a la mostrada por la coneja, cuya D.E.50 es de 15 U.I. según Housay (3); en tanto que es menos sensible que la rata inmadura cuya D.E.50 es de 0.97 U.I. según Albert y Berkson (23).

S U M A R I O

Usando por primera vez en nuestro país standard internacional de gonadotrofina coriónica, hemos observado modificaciones estacionales de la sensibilidad al desprendimiento de espermatozoides en el sapo común de Lima, en forma similar a la que presentan diversas especies de batracios en otros países.

Los resultados hemos apreciado por la dosis efectiva teórica en U.I. para cada estación; encontrando valores D.E.50 ó D.E.M. entre 9 y 15 U.I., con sensibilidad máxima en primavera, decreciente en verano y mínima en otoño, para volver a aumentar en invierno. Aplicando estos informes, como se comprende, se facilita en nuestro medio la determinación cuantitativa de la gonadotrofina coriónica en unidades internacionales, usando el Bufo spinulosus y con ayuda de las curvas dosis-respuestas para cada estación representadas en un diagrama, sin importar la época del año en que se trabaje. Con todo, creemos oportuno establecer que sólo es válido el método para las titulaciones en sangre y orina que se realicen en Lima; si hay la intención de aplicarlo en otras regiones del país, previamente conviene valorar en cada zona la sensibilidad específica del animal reactivo del lugar para evitar un posible error de cálculo.

Por otra parte, nuestro animal de laboratorio ha resultado más sensible que sus congéneres de otros países y comparable a la que presenta la coneja, aunque menor a la rata impúber. Por ello, juzgamos conveniente usar el Bufo spinulosus para determinaciones cuantitativas cuando se busquen niveles altos de gonadotrofinas coriónicas, en tanto que no es apropiado para niveles bajos.

B I B L I O G R A F I A

- 1.—HOUSSAY, B.A., LASCANO-GONZALEZ, J.M.: Relaciones entre la hipófisis y el testículo en el sapo, Rev. Soc. argent. Biol., 5: 77-88, 1929; abstr., L'hypophyse et le testicule chez le crapaud *Bufo marinus* (L.) Schneid, Compt. rend. Soc. Biol. Paris, 101: 938-40, 1929.
- 2.—HOUSSAY, B.A., GIUSTI, L. y LASCANO-GONZALEZ, J.M.: Implantación de la hipófisis y estimulación sexual en el sapo, Rev. Soc. argent. Biol., 5: 397-418, 1929; abstr. Implantation d'hypophyse et stimulation des glandes et des fonctions sexuelles du crapaud, Compt. rend. Soc. Biol. Paris, 102: 864-6, 1929.
- 3.—HOUSSAY, B.A.: Sensibilidad comparada de la coneja y el sapo macho a la gonadotropina coriónica, Rev. Soc. argent. Biol., 25: 22-6, 1949.
- 4.—HOUSSAY, B.A. y CORDERO FUNES, J.R.: Peso del sapo y espermiación por gonadotropina coriónica, Rev. Soc. argent. Biol., 30: 210-19, 1954.
- 5.—GALLI MAININI, C.: Reacción diagnóstica de embarazo en la que se usa el sapo macho como animal reactivo, Sem. méd., 54: 337-40 y 54: 447-54, 1947.
- 6.—GALLI MAININI, C.: Pregnancy test using male toad, J. Clin. Endocrinol., 7: 653-8, 1947.
- 7.—GALLI MAININI, C.: Estudio sobre la acción de la gonadotropina en el sapo macho, Rev. Soc. argent. Biol., 23: 125-30, 1947.
- 8.—GALLI MAININI, C.: Determinación cuantitativa de la gonadotropina coriónica urinaria en el sapo macho, Rev. Soc. argent. Biol., 25: 159-62, 1949.
- 9.—GALLI MAININI, C.: Influencia de la temperatura luz estación y dosis en la respuesta del sapo macho a la gonadotropina coriónica, Rev. Soc. argent. Biol., 25: 155-9, 1949.
- 10.—HARTMANN-PERDOMO, C. y CHAPMAN, C.W.: Reacción cuantitativa de la rana macho "*Rana pipiens*" a la acción de la gonadotropina coriónica, Rev. Soc. argent. Biol., 25: 146-55, 1949.
- 11.—PENHOS, J.C., CORNFIELD, J. y CORDERO FUNES, J.R.: Variación estacional de la espermiación del sapo por la gonadotropina coriónica, Rev. Soc. argent. Biol., 30: 77-87, 1954.
- 12.—PENHOS, J.C., CARDEZA, A.F.: Acción espermiante de los oxalatos en el *Bufo arenarum* Hensel, Rev. Soc. argent. Biol., 31: 123-30, 1955.
- 13.—SCHWEITZER, F.L., BAS, J.A.: Valoración y diferenciación de las distintas hormonas gonadotrofinas por su acción sobre el sapo macho *Bufo arenarum* Hensel. I Parte: gonadotropina coriónica y suéfica, Sem. méd., 55: 703-8, 1948.
- 14.—DEL CAMPO DE HACHEN, C.: Posibilidad de valoración cuantitativa de la reacción de Galli Mainini en sangre y orina, Bol. Soc. Obstet. Ginec. (Bs. Aires), 36: 469-77, 1957.
- 15.—HON, E.H. and MORRIS, J.McL.: Gonadotrophin titers in disturbed pregnancies, Surg. Gynec. & Obst., 101: 59-62, 1955.
- 16.—SAN MARTIN, M. y ZORRILLA, T.: Intento de dosaje cuantitativo de las gonadotropinas coriónicas, Rev. Fac. Med. Vet., 4: 50-5, 1949.
- 17.—ROE, C.C.: Standarización de la unidad sapo en el dosaje de gonadotropinas coriónicas, Lima, U.N.M.S.M. Fac. Med., Tesis (Br.) 2107, 1951.
- 18.—BURGOS, M.H., MANCINI, R.E.: Ciclo espermatogénico anual del *Bufo arenarum* Hensel, Rev. Soc. argent. Biol., 24: 328-36, 1948.
- 19.—GREENBLATT, R.B., CLARK, S.L. and WEST, R.M.: Hormonal factores producing gametokinetic response in male frog (*Rana pipiens*), J. Clin. Endocrinol., 10: 265-9, 1950.
- 20.—HASKINS, A.L. (Jr.), SHERMAN, A.I.: Quantitative bio-assay of chorionic gonadotrophin with the male frog, Endocrinol., 44: 542-5, 1949.
- 21.—TREVAN, J.W.: Error of determination of toxicity, Proc. Roy. Soc. s.B., 101: 483-514, 1927.
- 22.—TABARELLI NETO, J.F., GOMES, C.E.D.S. y FERNANDES FILHO, M.: Actividad gametocinética del ácido oxálico y de los oxalatos de potasio, sodio y amonio en el sapo macho (*Bufo marinus* L. y *Bufo paracnemis* Lutz), Rev. Soc. argent. Biol., 30: 233-40, 1954.
- 23.—ALBERT, A., and BERKSON, J.: Clinical bio-assay for chorionic gonadotropin, J. Clin. Endocrinol., 11: 805-20, 1951.
- 24.—MOISSET DE ESPANES, B.: Ensayo de valoración cuantitativa de la gonadotropina coriónica en el *Bufo arenarum* Hensel, Rev. Soc. argent. Biol., 33: 347-54, 1957.