

Reacción diagnóstica del embarazo en el bufo marinus con gonadotropinas séricas

Doctores Francisco de Castro Gómez
y Javier Isaza González.

N. B.: El informe preliminar fue presentado a la Sociedad de Biología de Bogotá, en la sesión del 5 de agosto de 1949.

INTRODUCCION

"... In an egyptian papyrus some 3.000 or 4.000 years old it is directed that should a woman wish to know whether or not she is pregnant she should place some earth and barley in a vessel and add a little of her urine each day. Should the barley grow she is pregnant" (*)

Y desde entonces, han sido numerosos los intentos para dar una respuesta científica a este eterno interrogante.

Existe toda una gama de métodos científicos unos, pseudocientíficos otros, basados los primeros en los cambios que determina el huevo en el organismo de la gestante.

(*) The Physiological basis of Medical Practice. Best and Taylor. Forth Edition, Williams & Wilkins Co., Baltimore. Ed 1945.

Tales métodos pueden agruparse, así: (1).

I — Modificaciones químicas

a) En las albúminas: Reacciones de Bordet Gengou; de Wassermann; de Abderhalden; de Sellheim, Lüttg y V. Mertz; de Vogel; de Donaggio; de Botelho; de Costa; de Kapeller-Adler.

b) En las grasas: Reacciones de Heinemann; de Neumann y Hermann.

c) En los hidratos de carbono: Reacciones de Frank y Nothmann; de Roubincheik; de Kamnitzer y Joseph; de Porges-Novak; de Adlesberg-Porges.

d) En los componentes minerales: Reacción de Kottmann.

e) En las enzimas o fermentos: Reacción de V. Dienst; de Pall; de Bar, Daunay y Ecalle; de Sivori, Ribaudi y Menniti.

II — Modificaciones físicas

a) En la eritrosedimentación: Reacción de Fahraeus-Hober-Linzenmeier.

b) En los tampones sanguíneos: Reacción de Manoiloff.

c) **En la tensión superficial del suero:** Reacción de Ascoli.

d) **En el índice leucocitario:** Reacción de Nito.

e) **En la contractilidad del útero:** Reacción de Lorrincz.

f) **En la sensibilidad de la pupila:** Reacción de Bercovicz; de Davis, Koni y Walker; de Takakusu.

g) **En la actividad biológica de los infusorios:** Reacción de Kustallow.

h) **En la coloración de los cabellos:** Reacción de Kosjakoff.

III — Modificaciones humorales

a) **Intradermo reacciones:** Con antígenos placentarios, calostro, etc. Reacción de Engelhorn y Wintz; de Gruskin.

b) **Con la hormona relaxina:** Reacción de Pommerenke.

c) **Con la hormona melanofórica:** Reacción de Konzuloff; de Glasser y Haempel; de Fleischmann.

d) **Con la hormona folicular:** Reacción de Cuboni; de Consoli; de Kahlert-Hasselmann.

Pero desde las experiencias de Ascheim-Zondek y Friedmann con hormonas gonadotrópicas, que como es sabido, durante la gestación alcanzan en la orina niveles que no se presentan en las condiciones normales (2), se han realizado múltiples pruebas biológicas con fines de diagnóstico precoz del embarazo (3 y 4). Casi todas ellas se basan en la acción folículo-estimulante de las gonadotropinas elaboradas por el organismo gestante, sobre ovarios inmaduros de animales jóvenes (Reacciones de Friedman, de Ascheim-Zondek, de Hoffmann, etc.

y sus distintas modificaciones); o en la ovoposición que determina en la hembra de la rana africana *Xenopus laevis* (test de Hogben), rana que tiene la particularidad biológica de poseer, durante todo el año en cautividad huevos en los oviductos, que nunca son arrojados espontáneamente (5), pero sí bajo el estímulo hormonal gonadotrópico.

Concretándonos únicamente al tipo general de reacción biológica citado en el párrafo anterior, debemos mencionar, que el estudio efectuado por Randall, Magath y Pansch (6) en la Clínica Mayo, sobre la Reacción de Friedman, dió los siguientes resultados:

"... Entre 645 casos se obtuvieron 10 reacciones negativas en presencia de embarazo y 7 positivas en ausencia de embarazo, es decir, 2,63% de reacciones inexactas.

Los autores destacan el hecho de que la reacción de Friedman, no es en sí un test diagnóstico para el embarazo, sino una demostración de que en una orina dada, existen sustancias gonadotrópicas capaces de estimular los ovarios del animal reactivo. Así, ocasionalmente, pueden presentarse reacciones positivas en una mujer no gestante, en casos tales como: a) Menopausia; b) Ciertos desórdenes endocrinos, especialmente del cuerpo pituitario, tiroides, suprarrenales, etc.; c) Algunos tumores del ovario o estados inflamatorios, tales como salpingo-ooforitis aguda; d) Tuberculosis de los órganos pelvianos; e) Tumores malignos; f) Los cursos de hormoterapia, cuando se administran derivados o similares de la anterohipófisis.

Las causas más comunes de falsas reacciones negativas según el trabajo ya mencionando —de Randall y asociados— serían: a) Práctica prematura del test; b) Pruebas efectuadas antes del aborto de tejidos coriónicos no viables; c) Orinas muy poco concentradas; d) Insensibilidad de los ovarios de la coneja; e) Excreción hormonal insuficiente; f) Lapso prolongado entre la recolección de orina y su utilización”.

Estas consideraciones pueden aplicarse a las reacciones de Ascheim-Zondek, sus modificaciones, y en general, a todas aquellas que usan como reactivo el tejido ovárico.

En cuanto al test de Hogben, a pesar de su bondad, no puede ser reproducido fácilmente entre nosotros, pues, ninguna de las especies nuestras de anfibios poseen las peculiaridades biológicas del *Xenopus leavis*.

En relación a los métodos químicos, el único digno de ser comentado es el de la valoración cuantitativa del glucuronato de pregnadiol sódico que se elimina durante el embarazo o en ciertos estados patológicos (Luteoma, Metritis Deciduíforme, enfermedad de Halvan, etc.) (7). Este método ideado por Guterman en 1944 (8) fue muy bien acogido en los medios científicos. Posteriormente, en un trabajo realizado en los Laboratorios del Connaught Medical Research de la Universidad de Toronto (9) sobre 90 casos de mujeres controladas clínicamente (Gestantes y no gestantes), se sacaron las siguientes conclusiones. “El diagnóstico del embarazo por las concentraciones del pregnadiol en la orina, teóricamente tiene un 88% de cer-

teza; pero en los casos relatados en el presente trabajo, se encontraron 8% de falsas positivas y 13% de falsas negativas, sobre 90 mujeres gestantes y no gestantes, controladas clínicamente. Por lo tanto, el procedimiento no es digno de la misma confianza que tienen los métodos biológicos para fines diagnósticos; sólo puede considerarse de alguna utilidad, particularmente cuando no hay facilidades para conseguir animales”.

Podemos igualmente considerar las reacciones que, con fines diagnósticos, han utilizado la metrorragia provocada por drogas parasimpaticomiméticas (Inhibidoras de la colinesterasa) del tipo de la fisostigmina, aplicadas en dosis adecuadas por vía parenteral, según el método de Soskin, Watchel y Hetcher (10). Aunque esta prueba da buenos resultados cuando no hay alteraciones orgánicas ni trastornos endocrinos, no puede ser considerada de utilidad desde el punto de vista de la patología clínica, pues, sólo responde en los casos normales.

En cuanto al test de Palmer, basado en la observación de las variaciones térmicas que se producen durante la ovulación, la premenstruación y la postmenstruación (11), puede parecer a primera vista de fácil realización y de utilidad en el diagnóstico de la preñez temprana. Pero en la práctica, carece de utilidad en los casos patológicos, pues, es obvio que la temperatura de base está sujeta a múltiples causas de variabilidad, y no es probable que en un caso dado se tenga de antemano un récord que permita apreciar el significado de una temperatura dada. En la práctica, este test

sirve más bien para determinar el momento de la ovulación en casos previamente seleccionados.

Ultimamente ha sido utilizada por S. S. Garret (12), la acción de la estrona sobre el desprendimiento del endometrio, en casos de amenorrea con ausencia de preñez, como diagnóstico negativo de gestación. Los relatos indican una sensibilidad del 100%, pero sólo constituye una prueba aplicable únicamente en casos en los cuales la amenorrea no dependa de estados diferentes a la gestación. Por otra parte, la reacción no puede practicarse cuando existe anemia, metrorragias, afecciones pelvianas, etc.

Se concluye lógicamente, de todo lo anterior, que ninguno de los métodos mencionados es satisfactorio, para el diagnóstico precoz del embarazo. Y que los mejores de estos métodos, actualmente en uso, sólo prestan una pequeña ayuda a las comprobaciones clínicas, desde el punto de vista obstétrico o ginecológico.

Reacción de Galli Mainini

Houssay y Lascano González, en sus investigaciones endocrinológicas, estudiaron la acción espermatocinética de las implantaciones de hipófisis en los sapos machos hipofisoprivos (13) y la producida en estos por la acción de extractos de hipófisis. Los sapos tienen la particularidad biológica de no poseer espermatozoides maduros —formas flageladas y móviles en la cloaca—, sino durante el período de celo (14).

Estos hechos fueron la base para una reacción biológica del embarazo, que Carlos Galli Mainini, de la Argen-

tina, llevó a la publicidad en su artículo "Reacción Diagnóstica del Embarazo en la que se usa el sapo macho como animal reactivo", aparecido en la Semana Médica de Buenos Aires, en marzo de 1947. Utiliza para la reacción un sapo clasificado como *Bufo arenarum* Hensel, al cual inyecta en el saco linfático lateral 10 centímetros cúbicos de orina matinal, tomada como para reacción de Friedman. La positividad de la reacción consiste en la aparición de espermatozoides muy abundantes entre los 45 minutos y las tres horas después de efectuada la inyección de orina, lo cual se demuestra extrayendo con pipeta el contenido de la cloaca del animal (15). En éste se ven espermatozoides muy móviles cuando la reacción es positiva.

Ante todo, llama la atención en esta prueba biológica, el hecho de ser la primera reacción en utilizar como elemento reactivo el epitelio testicular de un anfibio, reactivado con las gonadotropinas urinarias eliminadas por la gestante. Y en ello estriba su originalidad, pues parece ser que las gonadotropinas tienen una acción más electiva y específica sobre el epitelio testicular que sobre el ovario (16). Está comprobado que hormonas diferentes a las gonadotrópicas, presentes en estados patológicos que hacen pensar en un posible embarazo, son por sí solas capaces de provocar la maduración del folículo ovárico del animal reactivo, pero incapaces de producir acción alguna sobre el sincitio de Sertoli. Tal sucede con los tumores corticales de las glándulas suprarrenales, etc. (17).

Por las razones anteriormente expuestas, consideramos de gran interés y utilidad adaptar a nuestro medio los estudios de Galli Mainini, y aprovechar como animales reactivos a nuestros anfibios.

Estudio experimental

Iniciamos nuestros trabajos con el macho de una pequeña especie de anfibios, muy repartida en la Sabana de Bogotá, la rana verde, cuyo nombre científico es *Hyla labialis*. Escogimos inicialmente esta especie, por su abundancia y la gran facilidad de conseguirla en cualquier época del año. Sin embargo, las experiencias que con ella realizamos no nos dieron resultados satisfactorios, y hubimos de abandonarla por las siguientes causas:

a) Se encontró en los machos de la *Hyla* un estado de celo casi permanente; es evidente que la espermatogénesis inherente a tal estado es capaz de dar reacciones falsamente positivas (18).

b) El pequeño tamaño del macho de la *Hyla* hace que la inyección en el saco linfático dorsal sea casi una maniobra de adivinanza, y que la cantidad de sustancia reactivante introducida sea mínima.

c) La *Hyla* no tolera la inyección de orina natural, ni de las concentraciones urinarias, o del suero sanguíneo, en cantidad suficiente para determinar una respuesta uniforme.

d) En la *Hyla*, el reducido tamaño cloacal y la nula cantidad de orina almacenada, hacen casi imposible la obtención de muestras para investigar la presencia de espermatozoides.

En repetidas ocasiones tuvimos que recurrir a la maniobra de lavar la cloaca con solución salina, operación esta que traumatiza y causa la muerte de un número no despreciable de animales; aún más, en muchos casos la maniobra resultó inefectiva, habiendo tenido que sacrificarlos para obtener impresiones de testículos sobre porta-objetos con el fin de comprobar la presencia o ausencia de espermatozoides móviles. Este último recurso, como es natural, hace imposible el control previo de los animales reactivos.

e) En lotes numerosos inyectados con gonadotropinas de título conocido (Apoidina Parke Davis & Gonadin Serum Cutter), la respuesta obtenida fue irregular en cuanto a tiempo y dosis requerida, a pesar de la técnica sensiblemente uniforme y de que se seleccionaron machos de características iguales. En muchos casos no se obtuvo ninguna respuesta; la respuesta más precoz se consiguió a las dos horas, pero en numerosas ocasiones transcurrieron hasta 14 horas después de la inyección antes de hacerse evidente la reacción. En cuanto a las dosis necesarias para conseguir una respuesta positiva, variaron entre 30 y 50 unidades rata.

Todos estos factores nos indujeron a dejar de lado la *Hyla* como animal reactivo.

Las experiencias realizadas por varios autores con la técnica original de Galli Mainini, sobre un total de 2.661 casos controlados con otras reacciones biológicas y comprobados clínicamente mostraron un 98% de sensibilidad en la reacción (18). Además, en 1.166 pruebas practicadas con orinas

de sujetos no gestantes, controlados clínicamente, no hubo una sola respuesta positiva, lo cual da una clara idea de su especificidad (18). Otros autores como F. R. Merchante, encontraron la reacción sobre el epitelio testicular del sapo como la mejor entre trece pruebas propuestas para el diagnóstico del embarazo, y obtuvieron con ella 99,4% de certeza (19).

Simultáneamente a estos estudios, trabajaban los norteamericanos, quienes a partir del informe de Galli Mainini, aplicaron su técnica en la rana *Piptens* y modificaron la reacción en el sentido de no emplear orina natural, sino concentraciones urinarias obtenidas con acetona (20), o por el método de precipitación con coalín a un pH. ácido (21). Las publicaciones posteriores referentes a estas investigaciones demostraron un 99% de certeza sobre Q 200 casos comprobados clínicamente, 130 de los cuales correspondían a mujeres entre 30 y 35 días de gestación, es decir, 10 a 15 días después de la primera falla menstrual (22).

El conocimiento de estas observaciones nos indujo a perseverar en el empeño de adaptación del Galli Mainini a nuestros anfibios. Descartada la *Hyla labialis*, optamos por un animal de mayor tamaño y recurrimos al sapo común de las tierras calientes o *Bufo marinus*, con el cual se habían hecho ya algunos ensayos entre nosotros (23). Capturamos ejemplares de distintas regiones (Villeta, Viotá, Fuscasugá, Villavicencio, etc.), y continuamos nuestros trabajos, pero apartándonos de la técnica original de Galli Mainini.

La primera modificación consistió en suprimir la recolección con pipeta del contenido cloacal, pues ya conocíamos los informes de Weisman y C. W. Coates, quienes señalan la posibilidad de que esta manipulación puede falsear la reacción (24). Para evitar la recolección del contenido cloacal y el empleo de la pipeta, aprovechamos la particularidad que tiene el *Bufo marinus*, de lanzar orina como reflejo defensivo, reflejo que puede provocarse cada hora si se coloca el animal en medio húmedo adecuado.

La segunda modificación fue utilizar concentraciones urinarias como los norteamericanos.

Aunque los resultados fueron alentadores, no nos satisfacía completamente el tener que recurrir a la tarea siempre molesta y costosa de las precipitaciones con acetona o de los extractos con coalín a un pH. ácido, según el método de Scott.

Supusimos que al mayor tamaño molecular de la gonadotropina coriónica (25 y 26) correspondería una menor eliminación renal y una mayor concentración en el suero sanguíneo; y que al menor tamaño molecular de la gonadotropina hipofisaria estarían ligadas propiedades inversas, o sea, mayor eliminación renal y menor concentración sanguínea, por lo cual, al ser lanzadas al torrente sanguíneo, se retiene la primera y se elimina la segunda.

Por otra parte, como la gonadotropina coriónica se encuentra claramente y es dosificable desde el décimo sexto día después de la fertilización

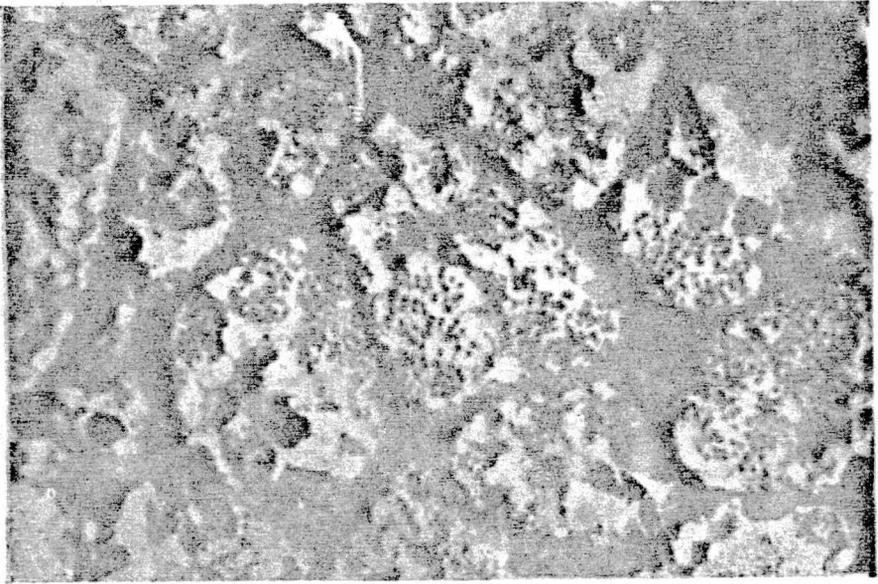


Foto No. 1

Epitelio testicular en reposo. Se ven: Células de Leydig, Syncitios de Sertoli y espermatoцитos. Aumento: aproximado 625

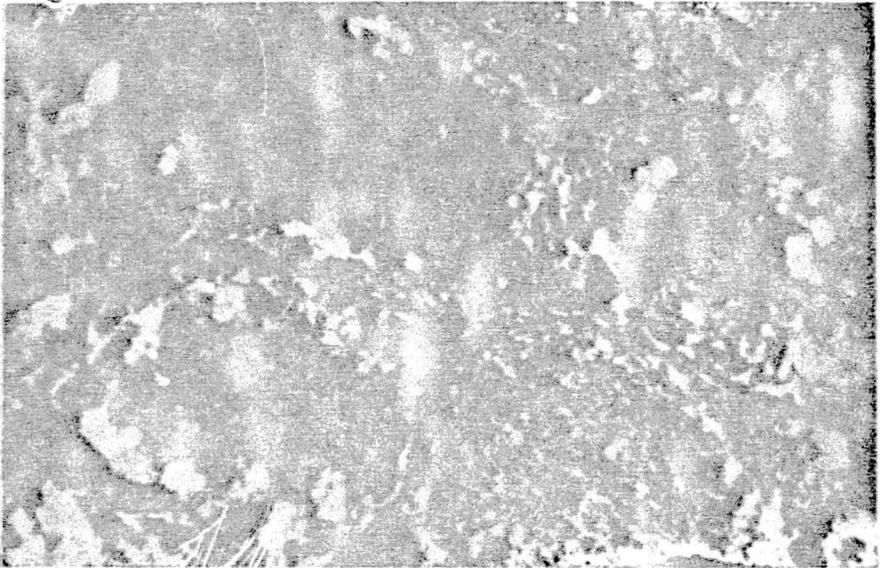


Foto No. 2

Epitelio testicular en plena respuesta. Nótese la gran abundancia de espermatozoides dentro de la luz de los tubos y la ausencia casi completa de espermatoцитos y células de Sertoli.

Aumento: aproximado 625

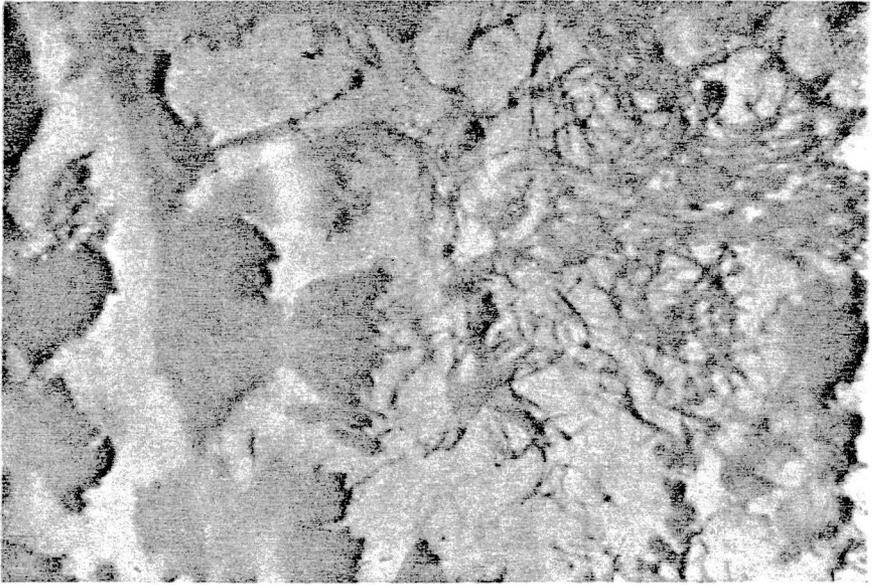


Foto No. 3

Detalle del epitelio testicular en respuesta: célula de Sertoli en plena maduración, espermatocitos desprendidos de la célula y espermatozoides en la luz del tubo. Aumento: aproximado 1.350

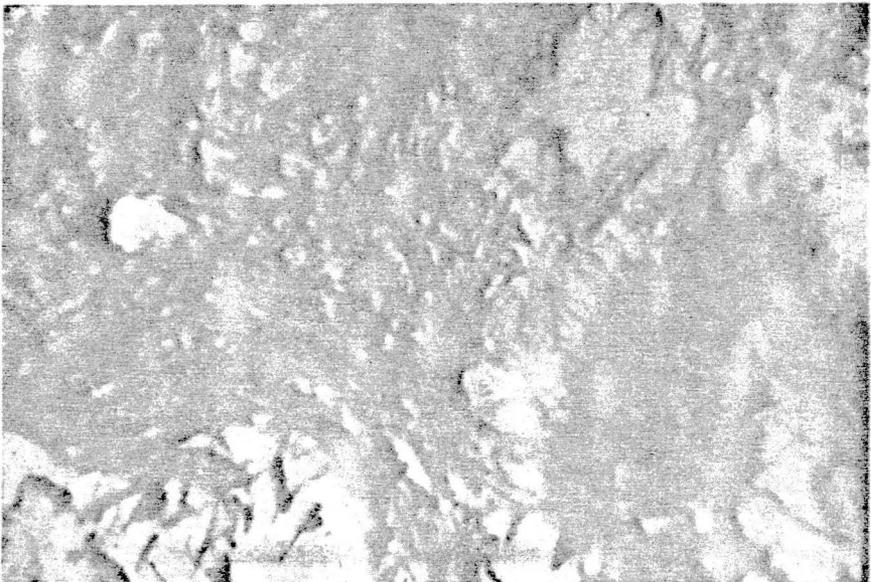


Foto No. 4.

Detalle a gran aumento, de la maduración de una célula de Sertoli. Aumento: aproximado 2.700.

(27), resolvimos apartarnos de las técnicas hasta entonces empleadas, abandonando el uso de las gonadotropinas urinarias o sus concentraciones, para utilizar las gonadotropinas del suero.

Técnica definitiva

Al adoptar este cambio fundamental, comenzamos por inyectar cantidades diferentes de suero sanguíneo de gestantes, con embarazo de certeza, a machos de *Bufo marinus* (peso aproximado de los sapos: 150 gramos), hasta obtener respuestas positivas uniformes.

Así pudimos comprobar que la cantidad de 1 cc. es suficiente en todos los casos de embarazo normal para desencadenar la respuesta positiva en un término aproximado de dos horas, contadas desde el momento de la inyección. Sin embargo, posteriormente y para evitar la posibilidad de que los embarazos hipo-hormonales pudieran dar una falsa respuesta negativa, establecimos la inyección sistemática de dos sapos: uno con 1 cc. y otro con 2 cc. de suero.

Como se ve, la reacción, efectuada sobre el epitelio testicular del sapo *Bufo marinus* y empleando como sustancia reactivante el suero sanguíneo, posee las siguientes características:

1) Extraordinaria sencillez en la ejecución y respuesta rápida, pues no requiere más tiempo que el necesario para la separación del suero y su inoculación al animal reactivo. En los casos positivos, la respuesta se obtiene generalmente entre la primera y la segunda horas; nunca después de seis horas.

2) Contrariamente a lo que sucede con la orina natural, sus concentraciones con acetona, o sus extractos con caolín a un pH. ácido, la inyección de suero sanguíneo es completamente inofensiva para el sapo.

3) Permite la obtención de reacciones siempre uniformes, pues la fuente de gonadotropinas empleadas como reactivante, no está sujeta a las múltiples variaciones de concentración, inherentes a la eliminación renal.

4) Es una reacción prácticamente específica para determinar la presencia de tejido corial en actividad, pues como se anotó en los párrafos anteriores, los caracteres físico-químicos de la gonadotropina coriónica —que solamente puede ser elaborada por el tejido corial o sus degeneraciones— le dan a esta hormona un quicio renal bastante mayor que el de las gonadotropinas hipofisarias, por lo cual, en el suero sanguíneo se encuentran casi exclusivamente gonadotropinas coriónicas.

Esta hipótesis está basada en los siguientes hechos:

a) Haber obtenido en nuestra serie de experiencias reacciones siempre negativas en mujeres con amenorreas secundarias cuyo curso clínico demostró la ausencia de embarazo y la presencia de fibromiomas uterinos, un caso de los cuales tenía reacciones de Friedman y Ascheim-Zondek positivas

b) Obtener reacciones siempre negativas al trabajar con suero de mujeres premenopáusicas, menopáusicas quirúrgicas y menopáusicas fisiológicas; amenorréicas con salpigo-ocolitis, quistes ováricos, o arrenoblastoma. En varios de estos casos hemos

inyectado 6 veces más cantidad de suero sanguíneo que el empleado para obtener una reacción positiva en un embarazo normal.

c) Haber obtenido reacciones positivas en numerosos casos de embarazo ectópico en los cuales el acto quirúrgico o el estudio histológico demostraron actividad del tejido corial. En estas ocasiones nuestra reacción prestó buena ayuda al diagnóstico clínico diferencial.

d) Ser positiva la reacción desde el tercer día de la primera falla menstrual con confirmación posterior de embarazo, clínicamente.

e) Trabajos efectuados sobre el "clearance" de la hormona coriónica gonadotrópica en el embarazo (28), demuestran una relación de 3.06 entre la concentración sérica y la concentración urinaria de la gonadotropina coriónica, o sea, un quicio renal bastante alto para esta hormona.

Reacción cuantitativa y unidad Bufo

El buen éxito de nuestras experiencias, nos llevó a buscar la cantidad de gonadotropina necesaria para obtener respuestas positivas uniformes en los animales reactivos, con el fin de hacer dosificaciones cuantitativas indispensables en los tests biológicos para el embarazo. Con este propósito inyectamos varias series de animales con gonadotropinas coriónicas e hipofisarias de título conocido (Apoirdina-Parke Davis; Dried Anterior Pituitary Gonadotrophin-Squibb). Pudimos establecer claramente que la dosis promedio requerida para obtener una respuesta positiva en la totalidad de los animales empleados (machos

de Bufo adultos de un peso promedio de 150 gramos), es de 40 Unidades Internacionales, ya se usen gonadotropinas hipofisarias puras, o coriónicas, hecho sobre el cual llamamos la atención e insistiremos sobre el mismo más adelante.

Así quedó determinada la unidad Bufo, equivalente a 40 Unidades Internacionales Rata (1), o sea la cantidad mínima de gonadotropina que provoca la espermatogénesis en el sapo macho adulto, entre una y dos horas después de la inoculación. Dicha espermatogénesis es claramente apreciable al examen microscópico directo del contenido cloacal y se hace presente en la totalidad de los animales inoculados.

En la serie de embarazos normales que hemos estudiado se han encontrado cifras de 1.000 a 2.000 unidades Bufo por litro de suero. En los casos comprobados de embarazo molar hemos encontrado títulos que oscilan entre 90.000 y 120.000 unidades Bufo de gonadotropinas por litro de suero.

Durante el curso de la determinación de la unidad Bufo pudimos observar los siguientes hechos dignos de ser mencionados:

a) Que existe en los anfibios un umbral para la dosis de gonadotropinas, por debajo del cual no hay respuesta; y que tal umbral puede ser rebasado al administrar dosis fraccionada

(1) Una Unidad Internacional es igual a la cantidad de hormona contenida en 0,1 miligramo de polvo patrón conservado en Londres. El polvo patrón es una mezcla del material enviado por casas productoras de todas las naciones (29).

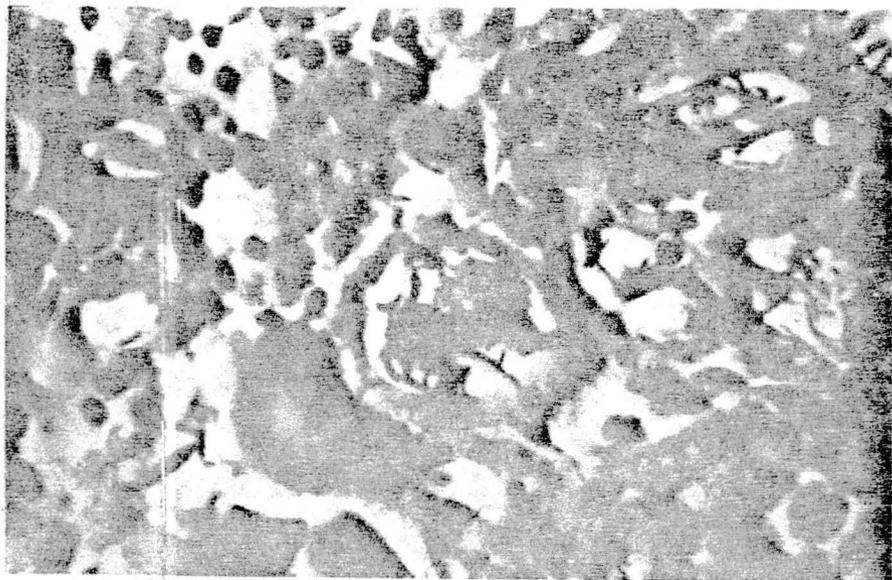


Foto No. 5.

Obsérvense los espermatozoides en los tubos colectores renales y en el parénquima renal. Corte de riñón de un anfibio en plena respuesta. Aumento, aproximado 2.700.

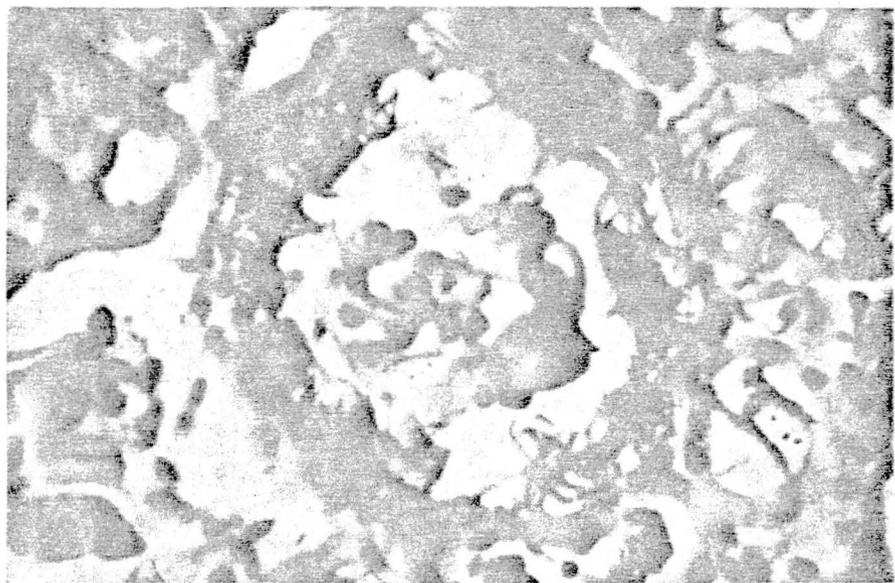


Foto No. 6.

Glomérulo. Se ven cápsula de Bowmann, ovillo glomerular, bloqueados por masas de espermatozoides. Corte de riñón durante la respuesta. Aumento, aproximado 2.700.

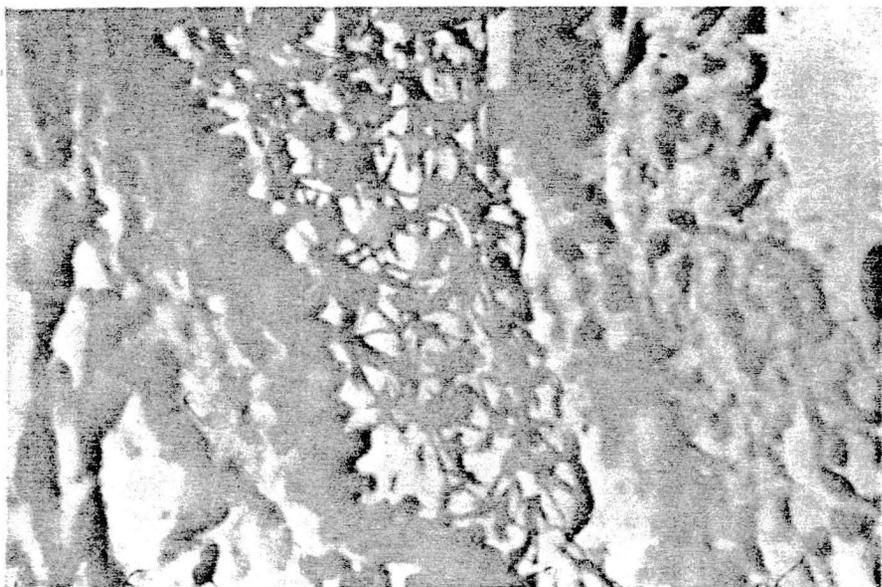


Foto No. 7.

Tubo renal colector con un cilindro de espermatozoides que ha bloqueado completamente su luz. Aumento: aproximado 2.700.

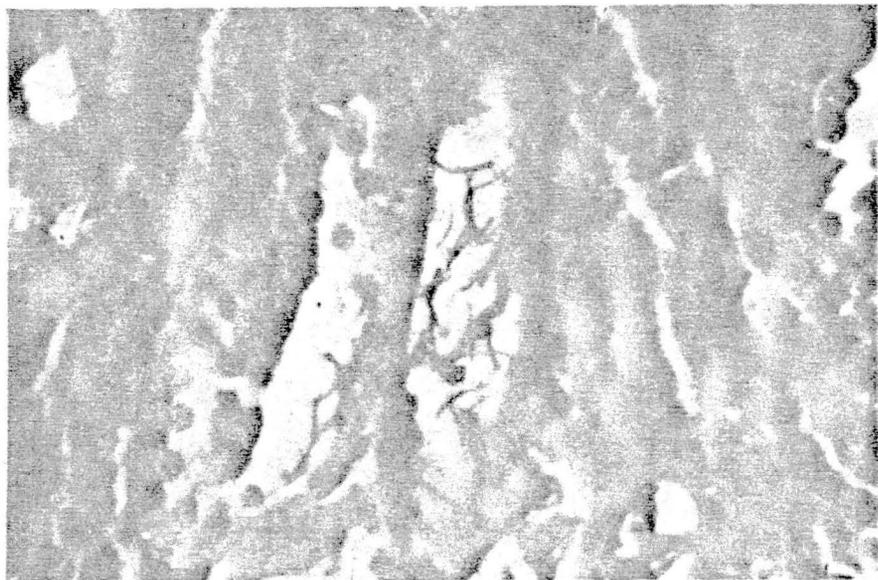


Foto No. 8.

Tubos renales con espermatozoides y espermatozoides dentro del intersticio. Aumento: aproximado 2.700.

das que suman su acción, si son inyectadas dentro de un lapso no mayor de 6 horas.

b) Que la respuesta es igualmente intensa con la dosis umbral o con dosis mucho mayores de gonadotropinas.

c) Que tanto los extractos anterohipofisarios puros como las gonadotropinas de origen coriónico, desencadenan la actividad del epitelio testicular del anfibio. Y que para tal acción se requieren dosis iguales de cualquiera de las dos gonadotropinas.

Mecanismo de la reacción

Los machos de todas estas especies tienen la particularidad biológica de que la maduración de los espermatozoides y su desprendimiento del sincitio de Sertoli, sólo se efectúa en el momento del celo por un estímulo hipofisario, en el que juegan papel predominante los cambios climatéricos estacionales. Aparte de esta época, el epitelio germinativo testicular se encuentra en reposo, como lo demuestran las preparaciones histológicas en las cuales sólo pueden apreciarse células de Sertoli, espermatoцитos y espermátides. (Foto número 1).

A diferencia de los vertebrados de sangre caliente, los anfibios no poseen recipientes colectores de esperma, y por lo tanto, una vez iniciada la espermatoquinesis —y tanto como ésta dure—, se encontrarán espermatozoides en el nefrón (tubos colectores renales, asa de Henle, espacio periglomerular, etc.) y en el contenido cloacal del animal.

Por las características anatómicas y funcionales anotadas, que pudiera-

mos calificar de rudimentarias en estos anfibios, podemos suponer que el mesonefros posea una cierta autonomía funcional dentro del conjunto orgánico y que lógicamente esté poco influenciado por los demás sistemas endocrinos. Y esta es la ventaja que posee como reactivo en las investigaciones hormonales de gonadotropinas.

Bajo la acción de dosis de gonadotropinas que rebasan el umbral reactivo del Bufo, todo el epitelio seminífero entra rápidamente en actividad. Se producen gran número de espermátides —cuya maduración es bien aparente en los cortes histológicos— y se liberan gran cantidad de espermatozoides muy móviles. (Fotos números 2, 3 y 4).

Cuando el umbral necesario para obtener una respuesta es alcanzado bruscamente, como sucede al inocularlos con sueros de embarazadas, los espermatozoides pasan al riñón en tan gran número, que llenan los canales colectores, el asa de Henle, los tubos contorneados proximales, y aún invaden el glomérulo, bloqueando el espacio que se encuentra entre el ovillo vascular y la cápsula de Bowman. (Fotos números 5 y 6).

En la serie de cortes histológicos practicados sobre mesonefros en plena respuesta son claramente visibles los espermatozoides en las distintas porciones del riñón citadas atrás, y aún pueden apreciarse muchos de ellos (los que han atravesado el epitelio de los tubos, la cápsula de Bowman y las paredes vasculares) en el tejido intersticial del riñón. (Fotos números 7 y 8).

Hemos comprobado que la respuesta positiva produce en los sapos lesiones características de glomerulonefritis aguda, con infiltración leucocitaria del parénquima y hemorragia, que más tarde provoca retracción del cvillo glomerular y degeneración hialino-granulosa del epitelio tubular. (Fotos números 9 y 10). En algunos casos son arrojados a la cloaca verdaderos cilindros espermáticos.

Estas lesiones renales suponemos sean la causa de que mueran los anfibios cuando han sido utilizados varias veces con respuestas positivas, y de que presenten antes de morir anuria y anasarca, con gran cantidad de líquido depositado en los espacios subcutáneos y en la cavidad de celoma. Estas lesiones impiden la utilización adecuada de los sapos para más de dos respuestas positivas.

Bases biológicas de la reacción

En los párrafos anteriores hemos explicado el mecanismo de los espermátogenesis en el sapo. Consideremos qué factores pueden utilizarse para provocar en él una espermátogenesis artificial, que sirva como reacción diagnóstica del embarazo.

Se sabe claramente que durante la gestación de algunos animales (monos antropomorfos, equinos y hombre) se eliminan por la orina y se encuentran en el suero sanguíneo grandes cantidades de hormonas gonadotrópicas (30) que proceden de dos fuentes diversas (31): el lóbulo anterior de la hipófisis (32), y el tejido corial, sólo presente en el embarazo o en ciertas degeneraciones del huevo, tales como mola hidatiforme y corioepitelio-

ma. En el hombre, en ciertos tumores malignos del testículo y teratomas, se elimina también una gonadotropina semejante a la coriónica (33).

Está plenamente demostrado que en la mujer, el tejido corial es el productor de la segunda de estas hormonas, llamada por tal razón "Gonadotropina coriónica" (34).

Y es la presencia de esta gonadotropina en el suero de la presunta gestante, cuando se encuentra en ella tejido corial en actividad, el factor determinante de una espermátogenesis artificial en el animal reactivo. A diferencia de otras reacciones biológicas para el embarazo, del tipo Friedman, Ascheim-Zondek, etc., y de la misma de Galli Mainini, que utilizan como reactivo las gonadotropinas hipofisarias que se eliminan por la orina, la reacción que presentamos en este trabajo, tiene por base la utilización de gonadotropinas coriónicas las cuales están presentes en el suero sanguíneo y son dosificables desde el dieciséisavo día de la fertilización (dos a cuatro días después de la primera falla menstrual), hasta la muerte del corion no obstante, sólo se encuentran en la orina, en cantidades apreciables, del tercero al sexto mes de la gestación, a causa del umbral renal de eliminación que les es propio. Quizá esta sea la razón de que las reacciones de tipo Friedman, Ascheim-Zondek o Galli Mainini, se hagan menos positivas a medida que avanza el embarazo, es decir, a medida que el hiperfuncionamiento hipofisario producido por la nidación del huevo, regresa y su papel de mantener activo el cuerpo amarillo queda a cargo de la placenta. Esto podría explicar claramente el hecho de haber

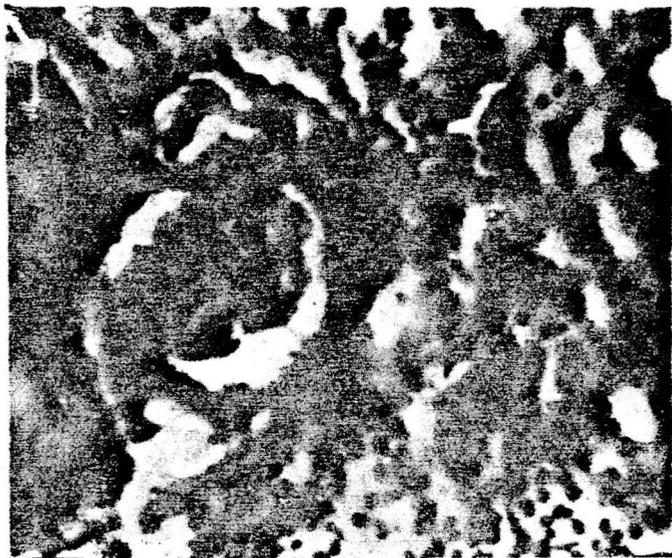


Foto No. 9.

Corte de riñón después de varias respuestas positivas. Se ve: parénquima renal con degeneración hialina, capsula de Bowman bloqueada totalmente por espermatozoides y tubos renales obstruidos por cilindros espermáticos. Aumento: aprox. 1.350

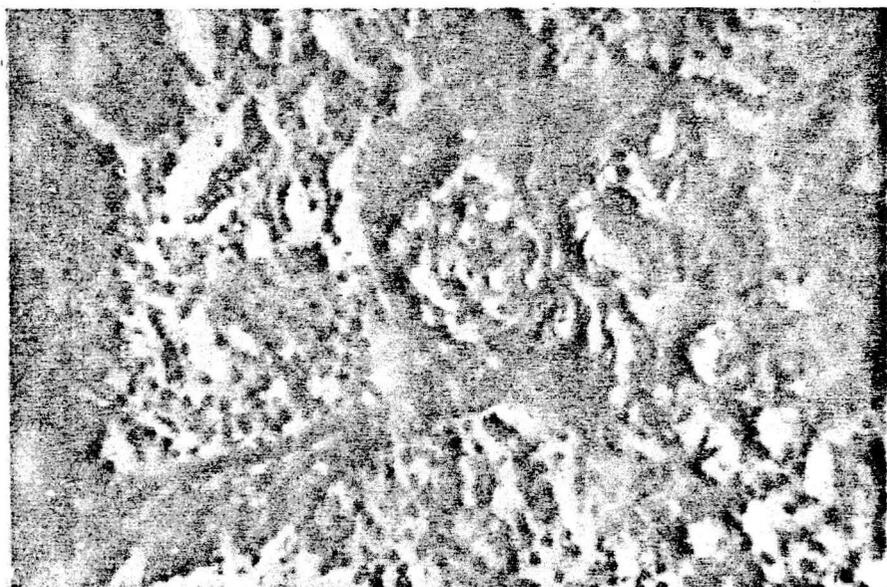


Foto No. 10.

La misma preparación anterior, degeneración hialina del parénquima, retracción del ovillo glomerular y fibrosis del mismo.

Aumento: aproximado: 1.350

Hemos comprobado que la respuesta positiva produce en los sapos lesiones características de glomerulonefritis aguda, con infiltración leucocitaria del parénquima y hemorragia, que más tarde provoca retracción del cvillo glomerular y degeneración hialino-granulosa del epitelio tubular. (Fotos números 9 y 10). En algunos casos son arrojados a la cloaca verdaderos cilindros espermáticos.

Estas lesiones renales suponemos sean la causa de que mueran los anfibios cuando han sido utilizados varias veces con respuestas positivas, y de que presenten antes de morir anuria y anasarca, con gran cantidad de líquido depositado en los espacios subcutáneos y en la cavidad de celoma. Estas lesiones impiden la utilización adecuada de los sapos para más de dos respuestas positivas.

Bases biológicas de la reacción

En los párrafos anteriores hemos explicado el mecanismo de los espermátogenesis en el sapo. Consideremos qué factores pueden utilizarse para provocar en él una espermátogenesis artificial, que sirva como reacción diagnóstica del embarazo.

Se sabe claramente que durante la gestación de algunos animales (monos antropomorfos, equinos y hombre) se eliminan por la orina y se encuentran en el suero sanguíneo grandes cantidades de hormonas gonadotrópicas (30) que proceden de dos fuentes diversas (31): el lóbulo anterior de la hipófisis (32), y el tejido corial, sólo presente en el embarazo o en ciertas degeneraciones del huevo, tales como mola hidatiforme y corioepitelio-

ma. En el hombre, en ciertos tumores malignos del testículo y teratomas, se elimina también una gonadotropina semejante a la coriónica (33).

Está plenamente demostrado que en la mujer, el tejido corial es el productor de la segunda de estas hormonas, llamada por tal razón "Gonadotropina coriónica" (34).

Y es la presencia de esta gonadotropina en el suero de la presunta gestante, cuando se encuentra en ella el tejido corial en actividad, el factor determinante de una espermátogenesis artificial en el animal reactivo. A diferencia de otras reacciones biológicas para el embarazo, del tipo Friedman, Ascheim-Zondek, etc., y de la misma de Galli Mainini, que utilizan como reactivo las gonadotropinas hipofisarias que se eliminan por la orina, la reacción que presentamos en este trabajo, tiene por base la utilización de gonadotropinas coriónicas las cuales están presentes en el suero sanguíneo y son dosificables desde el dieciseisavo día de la fertilización (dos a cuatro días después de la primera falla menstrual), hasta la muerte del corion no obstante, sólo se encuentran en la orina, en cantidades apreciables, del tercero al sexto mes de la gestación, a causa del umbral renal de eliminación que les es propio. Quizá esta sea la razón de que las reacciones de tipo Friedman, Ascheim-Zondek o Galli Mainini, se hagan menos positivas a medida que avanza el embarazo, es decir, a medida que el hiperfuncionamiento hipofisario producido por la nidación del huevo, regresa y su papel de mantener activo el cuerpo amarillo queda a cargo de la placenta. Esto podría explicar claramente el hecho de haber

obtenido respuestas positivas desde el tercer día de la primera falla menstrual en casos de embarazo comprobado posteriormente; respuestas positivas en las distintas etapas del embarazo y respuestas positivas aún dos días después de muerte letal comprobada, y que sólo se negativizaron después de cuatro días.

Por tales razones, la reacción positiva es un indicio claro de la presencia de tejido corial en actividad en el organismo del cual ha sido tomado el suero empleado para la inoculación del sapo.

DISCUSION BIOLOGICA

Sobre la acción de las gonadotropinas, en general, se admite lo siguiente:

a) Para la gonadotropina hipofisaria, la existencia de dos fracciones distintas: Una fracción folículo-estimulante F. S. H., con acción específica directa sobre el folículo de De Graaf, acción comprobada en ovarios de ratas hipofisoprivas; y otro fracción luteinizante L. H., que induce la formación de cuerpo amarillo en los folículos desarrollados, gracias a su acción selectiva sobre las formaciones de origen conjuntivo y que por tanto, carece de acción ovoquinética (35).

No obstante —y es lo que parece más probable— otros autores sostienen que estas dos acciones son producidas por una misma hormona y que la diferencia de respuesta se debe tanto a la dosis, como al estado del folículo en el momento de recibir el estímulo hormonal (36).

En cuanto a la acción de las gonadotropinas hipofisarias sobre el testículo, casi todos los autores sostienen

que la fracción folículo-estimulante tiene acción espermatogénica y puede aún reparar el epitelio de los tubos seminíferos en animales hipofisoprivos, pero sin ningún efecto estimulante sobre la porción intersticial (37); al paso que la fracción luteinizante, ejerce una acción directa sobre el elemento testicular de origen conjuntivo —células de Leydig—(38), pero sin ningún efecto sobre los tubos seminíferos.

b) La gonadotropina coriónica, sobre el ovario, sólo actúa como luteinizante.

En su acción sobre el testículo, Serringhaus niega a la gonadotropina coriónica toda acción espermatogénica (39), y el empleo principal terapéutico de esta gonadotropina en el macho, se basa en la acción estimulante sobre las células intersticiales de Leydig (40). Otros autores consideran su acción sobre la espermatogénesis, como secundaria al estímulo secretor del testículo y al aumento de la testosterona por este mecanismo (41).

Actualmente, para autores como J. M. Robson (42), citado por Laurence y Martin Hynes (43), dosis adecuadas de testosterona pueden impedir la degeneración del epitelio germinativo de los tubos seminíferos que sigue a la hipofisectomía en los animales y mantener la fertilidad, con restauración de la espermatogénesis. Y para Laurence W. Kinsell (44), la espermatogénesis puede producirse con altas dosis de testosterona, sin ninguna intervención de las gonadotropinas.

Pero en el curso de nuestras experiencias hemos podido comprobar, en los anfibios, hechos de gran interés, que no están de acuerdo con los conceptos hormonales expuestos atrás:

1) La gonadotropina coriónica pura (mola hidatiforme) produce, en los animales reactivos, una respuesta idéntica a la que se obtiene con dosis equivalentes de gonadotropina hipofisiaria pura (Dried Anterior Pituitary Gonadotrophin-Squibb).

2) La acción de la gonadotropina coriónica, es directa sobre el epitelio del tubo seminífero del testículo y no obra por la excitación de las células intersticiales y aumento consiguiente de la testosterona, puesto que en series de animales inyectados con dosis crecientes de Metiltestosterona Ciba, no logamos obtener espermatogenesis. En cambio, fue muy notoria la acentuación de los caracteres sexuales secundarios, traducida por el crecimiento del tubérculo digital, de la glándula parotoide e hipertrofia de las glándulas cutáneas; igualmente se observó una excitación muy marcada en los animales inoculados. Estos fenómenos no han sido observados en los animales que reciben gonadotropinas coriónicas o hipofisarias solas.

3) En la serie de animales inyectados con testosterona, no se encontró ni aumento ni disminución en las cantidades de gonadotropinas que se necesitaron para obtener de ellos una respuesta positiva. Tuvimos que emplear igual cantidad en los inyectados previamente con testosterona, que en los que empleamos como testigos; es decir, que no mostró la testosterona acción antagónica o inhibitoria, ni sinérgismo de acción, con las gonadotropinas.

RESUMEN

Presentamos una reacción para el diagnóstico precoz del embarazo, ba-

sada en una nueva concepción hormonal, con las siguientes características:

Sustancia reactivante: **Gonadotropinas coriónicas del suero.**

Animal reactivo: Sapo común de las tierras calientes (*Bufo marinus*) (45).

Tiempo de reacción: Entre una y dos horas, promedio (81%).

Estimación de la respuesta: Positiva, cuando se desencadena la espermatogenesis; negativa, ausencia de espermatogenesis.

Unidad biológica para determinaciones cuantitativas: **Unidad Bufo.** O sea, la menor cantidad de gonadotropinas que es capaz de provocar una respuesta positiva entre una y dos horas.

Hemos efectuado 469 reacciones de este tipo sobre 312 casos clínicos, repartidos así:

82 embarazos de certeza, con respuesta positiva.

10 embarazos probables, que fueron confirmados posteriormente, con respuesta positiva.

18 embarazos con signos clínicos de probabilidad, que dieron respuesta positiva.

16 embarazos tubarios, en los cuales hubo 14 respuestas positivas y 2 respuestas negativas.

3 embarazos molares, con respuestas positivas de 90.000 a 120.000 unidades Bufo por litro de suero (Reacciones cuantitativas).

1 embarazo con hidramnios, con respuesta positiva.

9 abortos completos, con respuesta negativa.

24 amenazas de aborto, con respuesta positiva, en las cuales continuó la gestación.

2 casos de "missed abortion", con respuesta negativas.

2 muertes fetales, con respuestas positivas al segundo día, negativas al cuarto día.

11 fibromas uterinos, con respuesta negativa.

2 arrenoblastomas, con respuesta negativa, uno confirmado histológicamente, otro con signos clínicos.

3 quistes del ovario, con respuesta negativa.

11 menopausias fisiológicas, con respuesta negativa.

8 castraciones quirúrgicas, con respuesta negativa, entre 20 y 40 días después de la intervención.

2 salpingitis T. B. C., con respuesta negativa.

108 Casos de amenorrea, entre 8 y 25 días; 76 con respuesta positiva y embarazo confirmado posteriormente y 32 con respuesta negativa, sin embarazo.

La reacción que presentamos, tiene características obvias de sencillez y prontitud, si se consideran la facilidad de la técnica y apreciación de la respuesta, y el breve lapso en que ésta se desencadena.

De precocidad, puesto que se han obtenido respuestas positivas ya desde el tercero al quinto día después de la primera falla menstrual, en embarazos comprobados posteriormente (9 casos).

De especificidad, dado que sólo la presencia de tejido corial activo provoca una respuesta positiva. No hay lugar a la interferencia de otros factores hormonales o humorales, como lo demuestra la negatividad constante en las menopausias fisiológicas y qui-

rúrgicas, en la fibromatosis uterina y en los tumores del ovario, casos en los cuales se ha inyectado hasta seis veces más cantidad de suero que el empleado para obtener una respuesta positiva en embarazos normales.

En cambio, la reacción fue positiva en 14 embarazos extrauterinos comprobados, y negativa en dos casos similares en los cuales no se pudo evidenciar histológicamente tejido corial por antigua muerte del huevo en uno y en otro por probable infección.

Otros ejemplos de especificidad, también muy ilustrativos, tomados al azar, son los siguientes: la reacción fue negativa en un caso de fibromatosis uterina, con reacciones de Ascheim-Zondek y Friedman positivas; en cambio, la reacción fue positiva al tercer día de la primera falla menstrual en una enferma irradiada años atrás, la cual había presentado antes falsas amenorreas, interpretadas equivocadamente como gestación con base en reacciones de Friedman y Ascheim-Zondek positivas. En esta paciente el embarazo se confirmó tres meses después de electuada la reacción.

La reacción es también sensible, pues se negativiza rápidamente en los abortos incompletos de menos de tres meses, cuando el huevo ha muerto (11 casos), y hemos obtenido igualmente la negatividad a los cuatro días de muerte fetal comprobada (2 casos).

Finalmente, la determinación de la Unidad Bufo y el haber establecido por medio de ella los valores en el embarazo normal y en la mola hidatiforme, permite hacer el diagnóstico de las degeneraciones del huevo con reacciones cuantitativas.

Hasta aquí hemos considerado el aspecto, pudiera decirse, puramente práctico de la reacción. En un terreno más científico, creemos de gran interés destacar los fundamentos biológicos de la reacción, que son precisamente **la identidad en sus acciones de las gonadotropinas coriónica e hipofisaria** sobre el epitelio testicular de los anfibios, según lo hemos demostrado con nuestro trabajo. Este hecho impone una revisión de las ideas hasta ahora consideradas como clásicas, en lo que se refiere a hormonas gonadotrópicas y prolanes.

Destacamos además la observación de que la gonadotropina coriónica, durante la gestación, por sus peculiaridades, de tamaño, peso molecular y umbral renal de eliminación, se encuentra en el suero sanguíneo en concentraciones muy suficientes y relativamente constantes, lo cual hace que el empleo del suero sanguíneo, sea mucho más aconsejable como reactivo que la orina, sus concentraciones o sus extractos.

CONCLUSIONES

1ª El epitelio testicular de los anfibios es actualmente uno de los mejores reactivos biológicos para la determinación y dosificación de las gonadotropinas.

2ª La reacción a que nuestro trabajo se refiere, efectuado con gonadotropinas séricas sobre el epitelio testicular del *Bufo marinus*, la consideramos sensible, específica, y de gran sencillez para diagnóstico precoz del embarazo.

3ª Esta reacción sirve para determinar claramente la presencia o ausencia de tejido corial en actividad, en un caso dado.

4ª La **Unidad Bufo** propuesta en este trabajo, permite la práctica de reacciones cuantitativas, tan útiles para la determinación de degeneraciones coriales.

5ª En los casos estudiados, se han encontrado entre 1.000 y 2.000 Unidades Bufo por litro de suero, en la gestación normal; y entre 90.000 y 120.000 Unidades Bufo en los casos de embarazo molar.

6ª Se ha comprobado en el curso del presente trabajo que la gonadotropina **hipofisaria** y la **coriónica** tienen idéntica acción biológica sobre el epitelio testicular de los anfibios con hipófisis intacta. Es éste un punto del mayor interés, puesto que con él se plantea un concepto hormonal nuevo, hasta hoy inaceptado.

BIBLIOGRAFIA

1. Pérez, Manuel Luis. Tratado de Obstetricia. 5ª Edición. Amiceto López. Buenos Aires, 1945. Vol. I. Págs. 214/219.
2. Jores, Arthur. Endocrinología Clínica. Edit. Labor, Barcelona, 1948. Págs. 375/376.
3. Ascheim, S. Am. J. Obst. and Gynec. 19:335, Mar, 1930.
4. Friedman, M. H. and Lapham, M. E. Am. J. Obst. and Gynec. 21:3405, Mar, 1931.
5. Hogben L. J. Lab. and Clin. Méd. 29:527, May, 1944.
6. Randall, Mogath et al. J. A. M. A. 114:471, 1940.

7. Novak, Emil. Textbook of Gynecology. Third Edition. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1948. Pág. 457.
8. Cutterman, H. S. The J. Clin. Endocrinol. 4:262/267, une, 1944.
9. Semmons, E. M. and Mc Henry E. W. The J. Clin. Endocrinol. 9:852/861. Sept., 1949.
10. Soskin, Watchel and Hetcher, J. A. M. A. 114:2090, May, 1940.
11. Palmer, A. Surg., Gynecology & Obst. 75:768, 1942.
12. Garrett, S. S. Am. J. Surg. 776:261, 1948.
13. Houssay, B. A. y Lascano González, Rev. Soc. Arg. Biol., 5:77, 1929.
14. De Robertis, E., Burgos, M. H. y Breyter, E. Rev. Soc. Arg. Biol. 21:369, 1945.
15. Galli Mainini, C. La Semana Médica. 54:337, 1947.
16. Glándulas Endocrinas, su fisiología, y terapéutica. Simposium preparado bajo los auspicios del Consejo de Farmacia y Química de la American Medical Association, Editorial Futuro, Buenos Aires. 1944. Págs. 99/100.
17. Crossen, H. S. and Crossen R. J. Enfermedades de la mujer, Uteha, México, 1946. Pág. 741.
18. Year Book of Obstetrics and Gynecology, 1948. Edited by J. P. Greenhill, Chicago. Págs. 26/27.
19. F. R. Morchante. La Semana Médica 55:2843/49, 1948.
20. Gradwohl, R. B. H. Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Fourth Edition. C. V. Mosby Co., St. Louis, 1948. Pág. 1157.
21. Scott L. D. Brit. J. Exp. Path., 21:320, 1940.
22. Joseph. N. Cutler. The J. of Lab. and Cl. Med. 34:554, April, 1949.
23. Sinisterra, M. Antonio. Tesis de Grado. (Bacteriólogo). 1948.
24. Year Book of Obstetrics and Gynecology, 1948. Edited by J. P. Greenhill, Chicago. Pág. 27.
25. Curtis, Arthur H. A. Textbook of Gynecology. W. B. Saunders Co. Philadelphia, 1947. Pág. 104.
26. Cotte, Gaston. Troubles fonctionnels de l'appareil génital de la femme. 3^e edition. Masson & Cie., Paris, 1949. Págs. 73/86.
27. Martin and Hynes. Clinical Endocrinology. J. A. Churchill, Ltd., London, 1948. Pág. 6.
28. Gastineau, Clifford F., Albert A. and Randall, Lawrence M. Clin. Endocrinol. 9:615-621. July. 1949.
29. Jores, Arthur. Endocrinología Clínica. Editorial Labor, Barcelona. 1948. Pág. 112.
30. Cotte, Gaston. Troubles Fonctionnels de l'appareil génital de la femme 3^e edition. Masson & Cie., Paris, 1949. Págs. 73/86.
31. Martin and Hynes. Clinical Endocrinology. J. A. Churchill, Ltd., London, 1948. Pág. 190.
32. Enale, Earl T., and Levin, Louis. Glándulas Endocrinas. Simposium de la Am. Med. Ass. Editorial Futuro, Buenos Aires, 1944. Pág. 104.
33. Selye, Hans. Textbook of Endocrinology. Universidad de Montreal, Montreal, Canadá, 1948. Pág. 675.

34. Hamblen, E. C. Endocrinología de la mujer. Buenos Aires. 1950. Págs. 2/8.
35. Selye, Hans. Textbook of Endocrinology. Universidad de Montreal, Montreal, Canadá. 1948. Págs. 2/8/9.
36. Fevold, H. L. & Hisaw, F. L. Am. J. Physiol. 1934, 19:655.
37. Selye, Hans. Textbook of Endocrinology. Universidad de Montreal, Montreal Canadá, 1948. Pág. 209.
38. Zondek, B. Las hormonas del ovario y el lóbulo anterior de la hipófisis. Editorial Labor, S. A. Barcelona, 1934. Pág. 195.
39. Sevringhaus, E. L. Endocrine Therapy in General Practice. Year Book Publishers, Inc., Chicago, 1938.
40. Selye, Hans. Textbook of Endocrinology. Universidad de Montreal, Montreal, Canadá, 1948. Págs. 2/8/10.
41. Martin and Hynes Clinical Endocrinology. J. A. Churchill, Ltd., London, 1948. Pág. 6.
42. Robson, J. M. Recent Advances in Sex and Reproductive Physiology. Third Edition, London, 1947. Pág. 116.
43. Martin and Hynes, Clinical Endocrinology. J. A. Churchill, Ltd., London. 1948. Págs. 156/157.
44. Kinsell, Lawrence W. J. Clin. Endocrinol. 7:781. December, 1947.

LABORATORIOS CLIN

PARIS

OCYTO-NARGENOL

(206 R. M.)

"El parto con dolores atenuados"

por inyección intra-muscular.

Dr. JOSÉ G. RUIZ VELEZ - Tesis de Doctorado (Cartagena-1948)

Dr. JESÚS MARÍA ALVAREZ R. - Tesis de Doctorado (Bogotá-1948)