

EXPULSION DE ESPERMATOZOIDES POR ACCION HIPOFISARIA EN EL SAPO

BERNARDO A. HOUSSAY

(Instituto de Biología y Medicina Experimental,
Costa Rica 4183, Buenos Aires)

En el *Bufo arenarum* Hensel la espermatogénesis se produce en espermatocistos o folículos, esto es en generaciones localizadas que provienen de una espermatogonía primaria única. Esta se reconoce por su gran tamaño y su núcleo polilobulado y está rodeada por células foliculares endoteliformes que le forman una envoltura completa. La espermatogonía primaria se divide repetidamente y forma un espermatocisto esférico de espermatogonias secundarias; éstas se dividen y transforman en espermatocitos primarios. En todos estos estados las células foliculares rodean al espermatocisto que aparece al corte como una aglomeración celular ovalada o esférica que hace saliencia en partes localizadas de la luz del tubo seminífero. Esto explica que al transformarse los espermatocitos en espermatides y luego en espermatozoides, los formados en cada espermatocisto quedan pegados por sus cabezas a las células de Sertoli con su cola libre en la luz del canalículo seminífero. De esa manera los espermatozoides forman un paquete o gavilla, con las cabezas adosadas entre sí como una empalizada o como una mata de paja o las pajas de una escoba. En la luz del tubo seminífero existen algunos espermatozoides libres o ensortijados. La estructura del testículo de *Bufo arenarum* Hensel, ha sido estudiada en varios trabajos (¹³, ¹⁹, ¹).

Las hormonas de la *pars distalis* de la hipófisis, favorecen

el desarrollo del testículo de *Bufo arenarum Hensel* y mantienen su estructura y función (9, 10, 6, 7).

La hipofisectomía o la ablación de la *pars distalis*, produce una atrofia testicular lenta, con disminución de peso (4, 5, 12, 13). La alteración más característica es la atrofia intensa del epitelio seminífero (y los espermatocistos) y el tejido intersticial; persisten las células de Sertoli, aunque más aplanadas y en ellas se insertan las gavillas de espermatozoides; además hay espermatozoides libres en los tubos (13). Si se practica una castración subtotal se observa una hipertrofia compensadora del resto testicular si el sapo es normal, pero no se produce si al sapo se le ha extirpado la *pars distalis* (14).

La implantación o inyección de *pars distalis* de hipófisis de sapo, estimula a la vez las funciones endocrinas y espermiática. El aumento de las hormonas testiculares se evidencia porque el sapo abraza a las hembras aún fuera de la época de actividad sexual y en cautiverio. Pero la inyección hipofisaria no provoca el abrazo si se extirpa previamente el testículo (12, 10). El abrazo se debe pues en este caso a una acción hipofisaria indirecta porque estimula al testículo endocrino y las hormonas testiculares provocan el abrazo. Si las inyecciones se repiten diariamente durante varios días se observa una hipertrofia del tejido intersticial (13).

La acción sobre las células de los canales seminíferos es intensa. En los sapos prepúberes, de unos 60 a 90 g, las inyecciones hipofisarias reiteradas varios días, provocan una actividad espermatogénica intensa (13). En renacuajos de *Rana catesbiana* pueden evacuarse del testículo elementos celulares en diverso grado de desarrollo (18). En los sapos adultos se observa acumulación de líquido en los tubos y desprendimiento de los espermatozoides. El testículo aumenta de peso y tamaño y parece más traslúcido, lo que se debe a la gran dilatación de los tubos seminíferos por el líquido y en éste se observan abundantes espermatozoides desprendidos, libres o en madejas, mientras que pocos o ninguno quedan como matas o gavillas insertados en las células de la pared del tubo (13, 12).

Los espermatozoides así liberados salen del testículo, aun en la época invernal y pasan por delgados vasos eferentes hasta el riñón (16, 17, 1). Allí desembocan en cierto número de nefrones

próximos al testículo y en ellos se hallan espermatozoides alrededor del glomérulo y en los tubos urinarios; en el sapo no llegan a la mayor parte de los glomérulos sino a algunos (1).

El mecanismo de liberación de los espermatozoides parece deberse a fenómenos de imbibición hídrica de las células de Sertoli. Estas se hinchan enormemente, presentan vacuolas y gotas eosinófilas de aspecto coloide, y luego se desprenden los espermatozoides (1).

Un gran adelanto práctico reciente, debido a Galli Mainini, es la comprobación (2) de dos hechos importantes: a) que la orina de mujer embarazada provoca la liberación de espermatozoides en el testículo y su expulsión por las vías urinarias; b) que es fácil encontrarlos en la orina recogida con una pipeta introducida en la cloaca. Esta reacción de Galli Mainini, permite el diagnóstico precoz del embarazo, con una técnica sencilla, específica, sensible, barata y rápida, en sólo 3 horas y aun a veces en 1 a 2.

La lesión ígnea del "tuber cinereum" produce dos efectos completamente diferentes en los sapos machos: a) provoca el abrazo; b) produce necrosis isquémica de la *pars distalis* de la hipófisis con reabsorción de sus sustancias activas. Ese abrazo sexual por lesión nerviosa se provoca en muchos machos, en cualquier época del año, aunque se les haya extirpado previamente la hipófisis o el testículo o ambos órganos (10). Es un fenómeno puramente nervioso sin participación de hormonas hipofisarias o testiculares.

La lesión ígnea tuberiana — una raya transversa con la punta de una aguja candente en la mitad del tuber — interrumpe los vasos sanguíneos que llevan sangre desde la cara ventral del tuber a la cara ventral de la hipófisis (8). Esta interrupción circulatoria produce un infarto anémico que necrosa la parte central de la *pars distalis* y su zona posterior y ventral, respetando sus partes anterior y superior, que reciben otros vasos que quedan intactos. Esa lesión tiene extensión variable, llega al máximo a los 7 días, se delimita hacia los 11 y luego se regeneran primero células cromóforas y luego cromófilas, reparándose la glándula al cabo de 23 a 31 días (15).

En la zona isquemiada se reabsorbe sustancia de la *pars distalis*, tal como si se hubiera implantado un fragmento de ella en ese sitio. Las gonadotrofinas reabsorbidas provocan la ovulación

de gran número de hembras. Este hecho fué descrito desde 1922 (3, 4, 5) pero sólo fué bien comprendido en 1930 (10). La quemadura tuberiana no produce nunca la ovulación si falta completamente la *pars distalis* de la hipófisis.

PARTE EXPERIMENTAL

Técnica. — Se buscó la acción de la anterohipófisis de provocar en el testículo la liberación de los espermatozoides, los cuales pasan a través del riñón y el uréter y aparecen en la orina y en el líquido cloacal. La verificación es simple, pues basta recoger el líquido ya sea: a) con la técnica de Galli Mainini (2) o sea introduciendo por el ano hacia adelante, en la cloaca, a 0,5 a 1 cm de profundidad, una pipeta de 1 a 2 cm³ de orificio ancho y bien romo o un tubo de vidrio; si el animal no orina espontáneamente, se pueden imprimir a la pipeta ligeros movimientos suaves hacia adelante o de vaivén o laterales; b) tomando el sapo con la mano izquierda, con la cabeza y patas hacia arriba y el orificio anal hacia abajo, se introduce verticalmente una pinza de disección sin dientes, cerrada, que se abre y cierra para provocar que el sapo orine; la orina cae sobre un embudo ancho colocado sobre un tubo de ensayo. Se practica el examen microscópico de la orina (en general a las 3, 6 y 24 horas de las inyecciones), lo que permite ver a los espermatozoides móviles. Cuando ellos son abundantes, la orina es opalescente o lechosa y hormiguan en enorme cantidad. Si son escasos pueden concentrarse por centrifugación.

Las inyecciones de sustancias ensayadas fueron subcutáneas, en unos 5 cm³ de solución salina a 6 ‰, salvo algunas endovenosas y algunas intratesticulares. Los sapos *Bufo arenarum* Hensel, pesaban entre 120 y 190 gramos, aunque hemos comprobado que sapos de 80 - 85 gramos dan reacciones positivas.

Los espermatozoides se paralizan casi inmediatamente en soluciones de Ringer o cloruro de sodio al 6,5 ‰. Se mantienen bien ágiles en agua de pozo, en líquido de Holtfreter (Cl Na 0,35 g, ClK 0,005, Cl₂Ca 0,01, CO₃H Na 0,02, agua 100 cm³) diluido al décimo con agua destilada.

No existen nunca espermatozoides libres en la cloaca o en la

orina de los sapos, salvo cuando están en abrazo sexual, pues entonces existen en abundancia.

RESULTADOS

Modificaciones observadas. — La inyección de hipófisis de sapo produce una reacción positiva, cuyas etapas son: el testículo se congestiona, aumenta al principio un poco de tamaño (*) (mediciones) y de peso y su aspecto es más traslúcido, lo que se debe a la acumulación de líquido que dilata los tubos y contiene abundantes espermatozoides libres. El líquido espermático turbio atraviesa el riñón y dilata visiblemente a los uréteres, de los que puede recogerse por punción con una pipeta capilar, luego pasa a la orina y a la cloaca.

Expulsión por inyección. — En el animal no inyectado hay espermatozoides en la luz del testículo y algunos en los canales deferentes que van del testículo al riñón, pero no en el riñón y nunca en la orina. Confirmamos la observación de Galli Mainini de que cortando suavemente el meso que une riñón y testículo, sin tocar a éste, los extendidos muestran algunos espermatozoides.

Inyectando líquido a presión en el testículo, clavando en éste una aguja unida a una jeringa, después de algún tiempo aparece en el uréter, líquido con espermatozoides. El hecho ha sido confirmado por Galli Mainini. Sin embargo la inyección de 0,05 cm³ a 0,075 cm³ de líquido no provoca expulsión de espermatozoides apreciable en la orina, aunque desprende en algunos tubos (observación de Cardeza).

Expulsión por expresión. — Expresiones o masajes suaves entre el pulgar y el índice, reiteradas cada 20 segundos durante pocos minutos, hacen aparecer espermatozoides en el ureter y aun en la cloaca, en algunos sapos.

Tiempo de acción. — En observaciones de 5 en 5 minutos, con dosis altas endovenosas (3 a 5 mg de *pars distalis* seca) se han observado espermatozoides en el uréter a veces a los 10 minutos y siempre a los 15 minutos. En la orina aparecen 1 vez sobre 3 a los 15 minutos, casi siempre a los 30 minutos y siempre

(*) El Dr. Galli Mainini es quien primero ha medido el aumento de tamaño.

a los 60 minutos. Por vía subcutánea es generalmente positiva a la hora y a veces antes, en otros casos entre las 2 y 4 horas.

Temperatura. — La acción es mucho más rápida en el sapo a 23°C, pero dura menos que en el sapo mantenido a 4°C siendo el umbral semejante en ambos casos o a menudo más alto a 4°C. Se tuvieron 5 animales a esas temperaturas desde un día antes y durante el experimento (Tabla 1).

TABLA 1
Expulsión de espermatozoides en sapos "*Bufo arenarum*"
120 a 190 g. Inyección subcutánea

Dosis "Pars distalis" seca de sapo - mg	Mantenido a			
	4°C		23°C	
	a 3 h	a 24 h	a 3 h	a 24 h
1	+	+++	+++	+
0,5	++	+++	+++	0
0,1	+	+++	+++	0
0,04	+	++	+	0
0,01	0	0	0	0
0,005	0	0	0	0

Dosis. — La dosis menor activa de *pars distalis* seca de sapo, parece ser 0,04 mg por sapo o quizás un poco menos, por vía subcutánea. La dosis menor activa de gonadotrofina coriónica (unidad tipo internacional son 15 unidades) 15, 15, 12,5, 17,5. Por lo tanto 1 mg de *pars distalis* seca, contiene 375 unidades internacionales y un gramo 375.000 unidades. Un lóbulo distal de sapo equivale a unas 225 unidades.

También son posibles las mediciones de gonadotrofina coriónica de las orinas de mujer embarazada (Tabla 2).

La gonadotrofina coriónica produce reacciones intensas por vía subcutánea o venosa, entre 100 y 50 unidades, medianas entre 40 y 25, débiles entre 20 y 15 (una vez 12,5), negativas con 12,5 o dosis menores. La acción de la gonadotrofina coriónica se obtiene también en los sapos privados de la hipófisis o de su *pars*

distalis. Con gonadotrofina de suero de yegua preñada, resultados negativos con 9 y 90 unidades, positivos dobles con 100 e intensos con dosis entre 200 y 1.000 unidades.

TABLA 2
*Acción de la orina de mujeres embarazadas
sobre la expulsión de espermatozoides en el sapo macho*

Meses de embarazo	cm ³ de orina inyectados					
	20	10	5	2,5	1,25	0,62
2	+++	+++	+++	+++	++	++
5	+	0	0	0	0	0
7	++	++	++	0	0	0

Especificidad. — Se obtuvieron resultados positivos intensos con inyecciones subcutáneas de lóbulos anteriores de hipófisis de ratas: con 5 lóbulos (1 vez), con 1 (3 veces); resultados negativos con 2 lóbulos (1 vez) y con una glándula (3 veces). Se obtuvo resultado positivo con 10 y 50 mg de polvo cetónico seco de lóbulo anterior de hipófisis humana.

La hipófisis de *Leptodactylus ocellatus* L. (Gir), fué activa en el sapo *Bufo arenarum* Hensel. La hipófisis de sapo, la gonadotrofina coriónica y la orina de mujer embarazada fueron activas en la rana *Leptodactylus ocellatus*.

Se inyectó subcutáneamente hormona folículo estimulante (FSH) purificada y hormona estimulante de células intersticiales (ICSH) pura, de hipófisis de oveja preparadas por Li y facilitadas gentilmente por el Prof. H. M. Evans. Se obtuvieron: a) reacciones positivas muy intensas con 1 y 4 mg de ICSH; b) reacciones positivas menos intensas con 1,5 y 5 mg de FSH; c) reacción muy intensas con mezcla de 2,5 mg de FSH y 5 mg de ICSH.

En series de experimentos se obtuvieron resultados negativos con lóbulos anteriores de hipófisis de buey, oveja y cerdo (200 mg frescos de cada uno), de conejo (1 a 5 lóbulos), de pejerrey, de dorado y de merluza, de perro (1 y 3 gl), de cobayo (1 gl), de gato (1 gl) de *Crotalus terrificus* (2 gl). Estos resultados podrían

no ser definitivos para estas especies. Acción negativa de adrenocorticotrofina (150 mg) y corticotrofina (250 mg) bien activas, preparadas por el Dr. Mendive. Hubo resultados negativos con extractos salinos de placentas de mujer y rata (5 cm³ equivalentes a 1-5 g de placentas frescas). El suero de rata preñada mató los sapos con 2,4 y 6 cm³ subcutáneos, sin provocar ovulación.

Resultados negativos con varias sustancias: a) con ácido ascórbico (*) 0,5 g (2 veces); con 1 g muerte en 5 horas con corazón en diástole; b) propionato de testosterona (Perandren Ciba) 30 mg; progesterona, 10 mg; acetato de desoxicorticosterona (Percorten Ciba), 10 y 25 mg, esta última dosis produjo parálisis; c) orina de rata preñada (5 cm³); d) Cl. de acetilcolina (10 a 200 mg, palidez con 150 mg o más, muerte con 400 mg, corazón en diástole); e) acetato de cobre (5 a 50 mg); f) Cl. de yohimbina (1, 2, 10 mg); g) ponzoñas de *Bothrops alternata* (2 y 5 mg) y *Naja tripudians* (2 mg); h) adrenalina (0,5 mg) y pitresina (10 unidades).

No tuvieron acción los órganos siguientes de sapo: hígado, riñón y suprarrenal, bazo, corazón, pulmón, músculo, lóbulo neurointermedio de hipófisis (2 veces, 10 lóbulos cada vez).

Ausencia de órganos. — Se han obtenido reacciones positivas por inyecciones de *pars distalis* en sapos privados de uno de los órganos o aparatos siguientes: sin encéfalo, con médula espinal destruida, sin pulmones, sin aparato digestivo, sin hígado, sin páncreas, sin tiroides, sin bazo o sin hipófisis. El Dr. Galli Mainini obtuvo reacciones positivas con orina de mujer embarazada y gonadotrofina coriónica en sapos sin hígado (confirmamos). Se obtuvieron en hipofisoprivas (Galli Mainini, Pinto, confirmamos).

Acción local en el testículo. — Se practicaron inyecciones intratesticulares de diversas sustancias suspendidas o disueltas en 0,05 cm³ a 0,075 cm³ de solución de cloruro de sodio isotónica. Esa cantidad de líquido no hace aparecer espermatozoides en la orina.

(*) El Dr. Tabarelli Neto (de Sao Paulo), comunica que obtuvo un resultado positivo en el sapo macho y que observó estímulo de la secreción de las glándulas del oviducto de los sapos hembras, lo que no hemos podido confirmar.

Se obtuvo aparición de espermatozoiles en la orina inyectando *pars distalis* de sapo, desde 0,3 mg hasta 0,015 mg, pero no se obtuvo con dosis de 0,01 mg o menores. No se consiguió con 10 mg de lóbulo anterior de hipófisis de hombre, vaca, oveja, cerdo y con un lóbulo de coneja, gallina, rata y serpiente. Resultados negativos con 3 mg de testosterona (propionato), estradiol, progesterona, etinilttestosterona, dietilestilbestrol (dipropionato), desoxicorticosterona (acetato); con 10 mg de colesterol y ácido ascórbico y con .1 mg de ponzoña de *Bothrops alternata*.

La histología muestra que la acción positiva se produce localmente en el testículo inyectado y no en el testículo del lado opuesto no inyectado.

Lesiones tuberianas. — Se quemó con una aguja al rojo, siguiendo una línea transversa en el medio del tuber, equidistante entre el quiasma y la hipófisis. Al cabo de 10 a 24 horas se encontraron algunos espermatozoides en la orina en 2 sobre 6; 3 sobre 5, y 3 sobre 5; en total 8 sobre 16. En 15 sapos privados de la *pars distalis* la quemadura tuberiana no hizo aparecer espermatozoides en ningún caso.

Excitación eléctrica de la cabeza. — Se practicó una excitación de boca a bóveda craneana, con corriente intensa de un carrete con interrupción con vibrador, aplicándola 30 segundos y con 30 de pausa 4 veces. Los animales quedaban semirrígidos, apneicos y paralizados por algún tiempo y sin reflejos; luego mejoraron lentamente. Ninguno expulsó espermatozoides.

DISCUSIÓN

La expulsión de espermatozoides en la orina y en la cloaca del sapo se produjo con gran rapidez por inyección de *pars distalis* de hipófisis de sapo o de orina de mujer embarazada.

El sapo hembra no ovula por acción de las gonadotrofinas coriónica y del suero de yegua preñada, hormona luteinizante y hormona folículoestimulante de oveja, hipófisis de rata y de hombre, mientras que el sapo macho resultó sensible a esas gonadotrofinas. La inactividad de otras hipófisis ensayadas quizás sea cuestión de cantidad de substancia activa empleada o interferencia de impurezas. .

La acción de fluidificar el esperma y aumentar la movilidad de los espermatozoides se observaría también en los peces, por acción de la inyección de hipófisis, según nos informa Tabarelli Neto.

Los resultados fueron positivos en los sapos entre enero y julio, meses en que se hizo el estudio. Confirmamos los resultados negativos señalados por Galli Mainini (2) con: estradiol, progesterona, testosterona, desoxicorticosterona, adrenalina y pitresina, y comprobamos la falta de acción de otras hormonas y diversas sustancias; no ensayamos la tiroxina, de acción negativa según Galli Mainini. Confirmamos sus resultados positivos con orina de mujer embarazada, gonadotrofina coriónica, gonadotrofina de suero de yegua preñada.

CONCLUSIONES

La inyección de *pars distalis* de la hipófisis produce en el testículo del sapo un desprendimiento de espermatozoides, los cuales pasan al través del riñón y aparecen en la orina. Producen también esta acción la gonadotrofina coriónica, aún en sapos hipofisoprivos, la del suero de yegua preñada (confirmando a Galli Mainini), la hormona luteoestimulante (ICSH) y en menor grado la folículoestimulante (FSH) de hipófisis de oveja, las hipófisis de rata, de hombre y de la rana *Leptodactylus ocellatus* (L.) Gir. No resultaron activas las hipófisis de varios animales, los órganos de sapo y numerosas sustancias. Por inyección intratesticular se obtiene acción localizada a ese testículo. La acción se observa a 23°C y es más lenta a 4°C. Se produce en ausencia del sistema nervioso o aparato digestivo o del hígado o pulmones o páncreas o hipófisis. Es posible realizar mediciones de gonadotrofinas. Las lesiones tuberianas pueden producir necrosis hipofisarias con reabsorción de gonadotrofina y ésta provoca la eliminación urinaria de espermatozoides.

SUMMARY

The injection of *pars distalis* produces the liberation of spermatozoa in toads testicles. The spermatozoa then pass through the kidney and appear in the urine. This action is also produced by

chorionic gonadotrophin, even in hypophysectomized toads, by that of the serum of pregnant mares (confirming Galli Mainini) by the luteo stimulating hormone (ICSH) and to a less extent by the follicle stimulating hormone (FSH) of the pituitary of sheep, rat, man and the frog *Leptodactylus ocellatus* (L.) Gir. The pituitaries of several animals were inactive and also other organs of the toad, and several other substances.

By intratesticular injection a local action is obtained in the injected testicle. The reaction occurs at 23°C and is slower at 4°C. It takes place in the absence of the nervous system, liver, lungs, pancreas or pituitary. Gonadotrophins can be determined semi-quantitatively.

Lesions of the tuber can produce pituitary necrosis with a reabsorption of gonadotrophin and elimination of spermatozoa.

Agradecemos las donaciones hechas por las casas: CIBA (Percorten y Perandren), ROCHE (Cl. de acetilcolina y ácido ascórbico), ESTRONA (estradiol), SQUIBB (gonadotrofina coriónica) y UNIFA (gonadotrofina de suero de yegua preñada).

BIBLIOGRAFIA

1. De Robertis, E., Burgos, M. H., Breyter, E.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1945, 21, 369; Proc. Soc. Exper. Biol., N. Y., 1946, 61, 20. — 2. Galli Mainini, C.: La Semana Médica, 1947, 64, 337. — 3. Giusti, L., Houssay, B. A.: Rev. Asoc. Méd. Argent., 1922, 35, 42 (Soc. Biol., 3, 42); C. R. Soc. Biol., Paris, 1922, 86, 1112. — 4. Giusti, L., Houssay, B. A.: Rev. Asoc. Méd. Argent., 1923, 36, 283 (Soc. Biol., 4, 77); C. R. Soc. Biol., Paris, 1923, 89, 739. — 5. Giusti, L., Houssay, B. A.: Rev. Asoc. Méd. Argent., 1924, 37, 155 (Soc. Argent. Biol., 5, 155); C. R. Soc. Biol., Paris, 1924, 91, 313. — 6. Houssay, B. A.: Vvestn. Endocrin., 1934, 4, (21-24), 693. — 7. Houssay, B. A.: New Engl. J. Med., 1936, 214, 913; Bol. Acad. Med. Bs. Aires, 1936, 133. — 8. Houssay, B. A., Biasotti, A., Sammartino, R.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1935, 11, 318; C. R. Soc. Biol., Paris, 1935, 120, 725. — 9. Houssay, B. A., Giusti, L.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1929, 5, 47; C. R. Soc. Biol., Paris, 1929, 101, 935. — 10. Houssay, B. A., Giusti, L.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1930, 6, 146; C. R. Soc. Biol., Paris, 1930, 104, 1030. — 11. Houssay, B. A., Giusti, L.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1930, 6, 207; C. R. Soc. Biol., Paris, 1930, 104, 1105. — 12. Houssay, B. A., Giusti, L., Lascano González, J. M.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1929, 5, 397; C. R. Soc. Biol., Paris, 1929, 102, 864. — 13. Houssay, B. A., Lascano González, J. M.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1929, 5, 77; C. R. Soc. Biol., Paris, 1929, 101, 938. — 14. Houssay, B. A., Lascano González, J. M.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1935, 11, 102; C. R. Soc. Biol., Paris, 1935, 120, 362. — 15. Lascano González, J. M.: Rev. Soc. Argent. Biol. 1935, 11, 309; S. R. Soc. Biol. Paris, 1935, 120, 723. — 16. Rugh, R.: Proc. Soc. Exper. Biol., N. Y., 1937, 36, 418. — 17. Rugh, R.: J. Exper. Zool., 1939, 80, 81. — 18. Rugh, R.: Anat. Record., 1946, 94, 398. — 19. Sáenz, F. A., Rojas, P. De Robertis, E.: Zschr. f. Zellf. u. mikr. Anat., 1936, 24, 727.