

OVULACION DEL SAPO "BUFO ARENARUM" HENSEL

I. — Gonadotrofina hipofisaria

BERNARDO A. HOUSSAY

(Instituto de Biología y Medicina Experimental.
Costa Rica 4185, Buenos Aires)

La hembra del sapo *Bufo arenarum* Hensei, ovula solamente por acción de las gonadotrofinas en condiciones fisiológicas o experimentales.

Abrazo sexual y ovulación. — Normalmente las hembras ovulan sólo durante o luego de un abrazo sexual prolongado, en épocas y en ambientes adecuados. Las hembras abrazadas van al agua y allí ponen sus óvulos que son fecundados después de salir al exterior.

Si se estimula a los machos a abrazar, mediante implantación de hipófisis en presencia del testículo o mediante lesión del tuber (en presencia o ausencia de la hipófisis o los testículos), las hembras en cautiverio desde hace días y mantenida en piletas o locales, no ovulan aunque sean abrazadas hasta dos y tres días seguidos, salvo rarísima excepción.

El abrazo sexual no provocó nunca la ovulación en las hembras privadas de la *pars distalis* de la hipófisis, a pesar de mantenerlas en condiciones naturales adecuadas. Esto parece demostrar que el abrazo provoca reflejamente una secreción de gonadotrofina hipofisaria, la cual pasa a la sangre y provoca la ovulación y postura ovular (10, 8).

Sin embargo, sólo por excepción la hemos podido demostrar en la sangre de hembras abrazadas o en ovulación. Inyectada en

Presentado a la Sociedad Argentina de Biología el 4 de septiembre de 1947.

las venas de una hembra no las hizo ovular, a la dosis de 2 cm⁸ a 15 cm³. Inyectada en los machos hizo expulsar espermatozoides sólo en un caso sobre quince experimentos.

Epoca de ovulación. — Durante 25 años se han anotado las épocas en que los sapos provenientes de San Martín, Villa Ballesster, o Florida llegaban abrazados o bien poniendo óvulos. La ovulación es favorecida por la temperatura alta, las lluvias recientes y el sol muy luminoso. La mayor parte de los años hubo ovulación en alguna fecha que varió habitualmente entre el 20 de agosto y el 10 de setiembre en días tibios y de sol. La fecha más temprana fué un 10 de agosto y la más tardía un 24 de enero. Lo habitual es que a fines de setiembre o comienzos de octubre se halle que la mayoría de las hembras (pero no todas) han evacuado los óvulos maduros, por lo que los ovarios están muy pequeños, amarillentos y sólo contienen óvulos chicos o medianos. En Córdoba la fecha común de ovulación es noviembre (1).

Implantación de hipófisis. — La implantación subcutánea o peritoneal o endocraneana de la *pars distalis* de *Bufo arenarum* Hensel provoca la ovulación de la misma especie (12, 10, 17). Es inactiva la implantación de lóbulo posterior. La hipófisis de sapo castrado tiene igual acción que la de sapo normal (18). Un tratamiento por estrona no modificó apreciablemente la acción gonadotrófica de la hipófisis del sapo (3 bis).

Lesión del tuber y ovulación. — Las quemaduras lineares transversales con aguja al rojo o los cortes transversales en la cara ventral del tuber, producen la ovulación en 20 a 80 % de las hembras con óvulos maduros. Estas lesiones tuberianas cortan los vasos superficiales bien visibles que van del tuber a la hipófisis (9). En esa forma se producen infartos anémicos, a veces muy grandes, en la zona central y posterior de la *pars distalis* (13). Se reabsorbe la gonadotrofina contenida en la zona isquemiada, como si se tratara de una implantación de hipófisis y a eso se debe la ovulación. La lesión del tuber provoca la ovulación solamente en presencia de la *pars distalis* de la hipófisis. Esta ovulación fué observada desde 1922 (1, 2, 3, 4), pero fué correctamente interpretada sólo desde 1930 (10, 8, 13, 9). Basta pinchar el tuber con la punta de una aguja candente para hacer ovular cierto número de hembras.

Lesiones de la hipófisis y ovulación. — Cortando con una tijera o apretando con pinzas la *pars distalis* se observan ovulaciones en cierta proporción de animales, existiendo siempre una zona necrótica glandular. Excepcionalmente la craneotomía sola provoca la ovulación; en esos casos hay zonas necróticas hipofisarias, mientras que en las hembras craneotomizadas que no ovulan estas zonas son mínimas o no existen.

Colocando pequeños algodones con ciertas substancias sobre la *pars distalis* de la hipófisis se observa la ovulación en cierto número de casos. En todos ellos hay una zona necrótica en la zona ventral de la *pars distalis*, que aparece basófila al azan; al parecer se debe a una isquemia. Se observó con: acetilcolina (5 %), eserina (7 %), mezcla de ambas, ácido clorhídrico 0,1 N, cloruro de sodio (10 %). En algunos pocos casos se observó con solución cloruro sódica (0,65 %), y aún con algodones secos. En todos esos casos había zonas necróticas en la *pars distalis*. La ovulación se debió en todos los casos citados a la lesión de infarto anémico hipofisario con reabsorción de gonadotrofina de la zona de *pars distalis* necrosada.

Sexo y estación. — Confirmamos que a igual peso es más activa la *pars distalis* del sapo hembra que la del sapo macho (¹⁹); en cambio la hipófisis del macho pesa un poco más que la de la hembra (¹⁷). La actividad gonadotrófica existe durante todos los meses del año, siendo algo mayor al final del invierno desde julio hasta setiembre (¹⁹). La menor dosis activa ha sido 0,05 mg de polvo seco de *pars distalis* de hembra que hizo ovular hasta 20 % de las hembras (¹⁷). Las hembras inyectadas ovulan rara vez en octubre y noviembre, si han evacuado recientemente sus óvulos grandes y sólo poseen pequeños y medianos; pero vuelven a ser sensibles más tarde, en especial desde marzo en adelante y responden al máximo al fin del invierno desde julio a setiembre, o sea cuando sus ovarios están desarrollados al máximo y los óvulos son grandes. De enero a marzo las ovulaciones son a menudo parciales, según el estado del ovario, expulsándose sólo los óvulos bastante grandes y no los medianos o pequeños. Más tarde predominan los óvulos grandes y la expulsión es abundante o total (¹⁹). Las variaciones estacionales del peso del ovario han sido estudiadas por Mazzoço (¹⁵),

las del cuerpo adiposo por Mazzocco (¹⁶) y por Allende y Orías (¹ bis) y las de la hipófisis por Masselin (¹⁴).

Temperatura. — Ovularon los sapos inyectados y mantenidos entre 16° y 35°, pero no hubo ovulación a 4°, 8° y 10°. La ovulación más rápida, con inyecciones endovenosas de 2 a 10 mg de glándula seca comenzó a las 6-7 horas después de la inyección y fué total a las 8-10 horas; con 1 a 5 mg a 30° comenzó a las 5-6 horas y fué total a las 8-10 horas.

Ovulación de hipofisoprivas. — El ovario de sapos sin *pars distalis* de la hipófisis se vuelve después de algún tiempo menos sensible a la acción gonadotrófica; así a 23°; ya al cabo de 24 y 48 horas la dosis límite fué: en los sapos sin *pars distalis* con 0,6 y 0,5 mg ovuló la mitad de los sapos pero no con 0,4, 0,3, 0,2 mg; los testigos ovularon con 0,4 y 0,3 mg y no con 0,2 y 0,1 mg. Después la sensibilidad fué disminuyendo; así a los 16 días de operadas no ovularon con un lóbulo (*pars distalis*) endovenoso, como los testigos, pero ovularon con 2 lóbulos; a los 28 días no ovularon con 2 ó 3 lóbulos y sólo parcialmente con 4 lóbulos. En otro experimento se necesitó para provocar la ovulación: 0,25 mg de *pars distalis* seca de sapo (vía subcutánea) para las hembras normales y 3 mg para las privadas de *pars distalis* 34 días antes, o sea doce veces más.

Dosis. — La dosis varía con la sensibilidad del animal inyectado (tamaño de los óvulos, estación) y la temperatura. En locales a 22° el porcentaje de animales que ovula crece en relación con la dosis (¹⁷), hasta cierto límite, así en un experimento obtuvimos 10 % de ovulaciones con 0,4 mg, 50 % con 0,5 mg, 80 % con 0,60 mg y 100 % con 0,75, 1, 3, 5, 7, 10 mg. El tiempo en que se produjo la ovulación fué idéntico con 3, 5, 7 y 10 mg. Con dosis más pequeñas la ovulación es parcial y a veces se liberan sólo 40 a 500 óvulos grandes y no todos los del ovario. Con dosis aún menores ya no hay ovulación. Repitiendo cada 2 a 3 días una dosis subliminal de *pars distalis* se observa acumulación de efectos y ovulación en cierto porcentaje de sapos (¹⁷).

Persistencia en la sangre. — Se inyectaron varias hembras de 200-250 g de peso con 10 mg de polvo de *pars distalis* de *Bufo arenarum*. Al cabo de tiempos dados se extrajo sangre de la aorta y se inyectó por vía endovenosa a hembras, mantenidas a 23°. De

la sangre de cada tiempo se inyectaron a diferentes sapos 1, 2, 3, 4, 5 cm³ y a veces 10 cm³. Se usaron 2 a 3 sapos para cada dosis.

TABLA 1

Persistencia de gonadotrofinas inyectadas en la circulación de "Bufo arenarum" Hensel (200 a 250 g). Diez mg "pars distalis" seca de hipófisis del mismo sapo por la vena abdominal

	Polvo seco pars distalis sapo. mg	Ovulación en horas, con sangre recogida				
		En seguida	1 h ³	2 h	5 h	24 h
Ovularon ..	1	1 cm ³	3	4	—	—
No ovularon	0,5	0,5	2	3	10	10
Contenido en mg por cm ³ de sangre .	—	1	0,33	0,25	—	—

Caracteres de la gonadotrofina. — La gonadotrofina es soluble en agua, insoluble en alcohol, éter o cloroformo y no ultrafiltra por membrana de colodio ni dializa (12).

Especificidad de la gonadotrofina. — La *pars distalis* de *Bufo arenarum* Hensel produce la ovulación y postura ovular en los batracios: *Bufo arenarum* Hensel, *Bufo marinus*, *Bufo paracnemis*, *Leptodactylus ocellatus* (L.) Gir., *Bufo D'Orbigny* (10) y *Xenopus laevis* (21). La *pars distalis* de este sapo no tiene acción gonadotrófica: a) en la coneja (vía endovenosa, hasta 10 mg de polvo); b) en la ratita prepúber (8) (ni con 200 lóbulos, o sea 660 mg frescos, 110 mg secos) (2, 3); c) en ratas hembras o machos hipofisectomizados (ni con 140 lóbulos en 14 días, o sea 462 mg fresco, 77 mg seco) (2, 3).

Las únicas hipófisis que han hecho ovular a *Bufo arenarum* Hensel en algunos casos, son las de los batracios *L. ocellatus* y *Bufo D'Orbigny* (10), *Bufo marinus* y *Bufo paracnemis* aunque fueron menos activas que las del mismo *Bufo arenarum* Hensel.

La *pars distalis* de *Bufo arenarum* Hensel hace al mismo sapo ovular aunque se hayan extirpado el encéfalo delante de la protuberancia, separado la médula del bulbo o destruido el tuber (10);

no es necesaria la presencia de alguno de los órganos siguientes: hígado, riñón y suprarrenal, páncreas, tiroides, aparato digestivo completo, cerebro anterior e intermedio, tuber e hipófisis (¹⁷), y los oviductos (¹).

TABLA 2

Las sustancias siguientes no produjeron ovulación en sapos hembras Bufo arenarum Hensel a 23°C. Días después los mismos sapos reactivos ovularon inyectándoles un lóbulo de hipófisis de sapo

<i>Lóbulo anterior de hipófisis de</i>	<i>Dosis por sapo mg</i>	<i>Via</i>
Buey	10 - 350 - 500	Endovenosa, subcutánea
Oveja	10 - 200 - 600	Endovenosa
Cerdo	10 - 250 - 350	id. id.
Perro	5 - 100	Subcutánea
Cobayo	2 a 10 lóbulos	id. id.
Rata	3 a 12 lóbulos	Endovenosa
Coneja	2 lóbulos ant.	id. id.
Gallina	5 a 25	id. id.
Corvina	100 a 185 (¹)	Subcutánea
Gl. subneural de ascidia (Tethyum plicatum)	40 complejos (¹)	id. id.
Gonadotrofina suero yegua	400 a 1000 U.I. (²)	Subcutánea, endovenosa
Gonadotrofina coriónica	200 a 500 U.I. (³)	id. id.
Ambas gonadotrofinas	400 U.I. equina (²) más 200 U.I. coriónica (³)	id. id.
Ambas más 2 lób. ant. rata	id. id.	id. id.
Orina de mujer embarazada	10 a 20 cm ³	

(¹) Polvo cetónico.

(²) Lobantina "Unifa".

(³) Folluteína "Squibb".

No hacen ovular al sapo "Bufo arenarum" Heinsel:

A) Las inyecciones de extractos de los órganos siguientes del mismo sapo: lóbulo posterior de hipófisis, testículo, hígado, riñón, infundíbulo, encéfalo (¹², ¹⁰), ovario, líquido de lavado del ovario en ovulación o de óvulos sueltos en el abdomen al ovular.

B) Los lóbulos anteriores (*pars distalis*) de hipófisis de buey (¹⁰, ¹⁷); perro, cobayo, rata, corvina, pollo y serpiente (¹⁰); de oveja, cerdo, coneja, cobayo, rata, etc. (ver tabla 2); de *Xenopus laevis* (⁷); la glándula subneural de ascidia (tabla 2).

C) Houssay y Giusti (1930) por inyecciones diarias de extracto alcalino de lóbulo anterior de hipófisis bovina a varias hembras observaron la expulsión de algunos óvulos sólo en dos hembras al cabo de 4 y 12 días. La acción fué débil, incompleta y excepcional a pesar de las dosis elevadas. Con una sola inyección no hubo nunca ovulación. Convendría repetir los ensayos con dosis altas de gonadotrofina folículoestimulante o luteinizante de hipófisis de mamíferos muy purificadas y muy activas.

El Dr. Galli Mainini obtuvo ovulación con gonadotrofina coriónica, lo cual pudimos confirmar, en el mes de octubre. La inyección fué $\frac{1}{3}$ subcutánea y $\frac{2}{3}$ intramuscular ($\frac{1}{3}$ en cada pata anterior). Con 2.000 unidades no ovularon las dos inyectadas; con 1650 unidades ovularon 3; una en forma completa, otra abundante y no completa y la tercera con muchos óvulos sueltos. Con 500 unidades una no ovuló y otra en forma incompleta aunque bastante abundante. Dos hembras privadas del lóbulo distal de la hipófisis ovularon con 1650 unidades, una en forma completa y la otra abundante e incompleta.

Hubo ovulación con 40.000 unidades de gonadotrofina de suero de yegua preñada, pero no con 10.000. Bastaron 100 unidades, en el sapo macho, para producir la expulsión de espermatozoides en la cloaca.

Son inactivas la orina de mujer embarazada (^{10, 1}), la orina de rata preñada (5 a 10 cm³) la mezcla de orina de embarazada con ánterohipófisis de rata o de buey (tabla 2) (*). No fueron activos los preparados de hormona folículoestimulante o luteinizante de hipófisis preparados según Févold (²⁰). Resultaron inac-

(*) Del Castillo y Novelli (Rev. Soc. Argent. Biol., 1937, 13, 448) observaron que la hipófisis de sapo reforzó la acción de la orina de mujer embarazada sobre el ovario de ratitas preñadas.

tivas ia estrona (^{10, 1}), benzoato de estradiol (10 mg), propionato de testosterona (30 mg) y progesterona (10 mg) (¹), acetato de desoxicorticosterona (10 mg), propionato de dietilestilbestrol (5 y 20 mg), córticoadrenotrofina (250 mg).

E) La inyección subcutánea de dosis escalonadas de varias sustancias, hasta llegar a las tóxicas, como ser: acetilcolina (200 mg, mueren con 400 mg), eserina (1 a 5 mg), yohimbina (1 a 5 mg), nicotina (1 a 2 mg), adrenalina (1 mg), pituitrina (10 unidades), acetato de cobre (2 a 200 mg), ácido ascórbico (200 y 500 mg, con 1 g, muerte).

F) La inyección en un saco ovárico de gonadotrofina de suero de yegua preñada (3000 unidades), propionato de testosterona (5 mg).

Acción sinérgica del estradiol. — La adición de benzoato de estradiol aumentó algo la sensibilidad del ovario a la gonadotrofina hipofisaria (tabla 3). La inyección de progesterona (5 mg), propionato de testosterona (20 mg) o de acetato de desoxicorticosterona no impidió la ovulación de sapos inyectados con 1 mg de *pars distalis* seca de hipófisis de sapo.

TABLA 3

Acción del benzoato de estradiol sobre la acción gonadotrófica de la "pars distalis" de hipófisis de sapo Bufo arenarum Hensel

Dosis de <i>pars distalis</i> mg ..	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
	<i>Hembras que ovularon</i>						
<i>Pars distalis</i> sola	0/3	0/3	0,3	1/3	3/3	3/3	ε/ε
<i>Pars distalis</i> y 3 mg de benzoato de estradiol	0,3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1) La ovulación de *Bufo arenarum* Hensel se produce porque el abrazo sexual provoca la secreción de gonadotrofina hipofisaria, la cual vá por vía sanguínea y produce la ovulación y ovoposición. Sin *pars distalis*, el abrazo no hace ovular.

2) Se describen las propiedades de la gonadotropina hipofisaria del sapo y su acción en diferentes condiciones, el tiempo de su desaparición de la sangre, variaciones estacionales, etc.

3) Las intervenciones sobre el tuber o la hipófisis pueden provocar oclusiones de vasos de *pars distalis*, reabsorción de la gonadotropina de la zona isquemiada y por lo tanto ovulación seguida de ovoposición.

4) La gonadotropina del sapo fué activa en la hembra del sapo y de varios batracios, pero fué siempre inactiva en los mamíferos.

5) La hembra de *Bufo arenarum* Hensel no respondió más que a las gonadotropinas hipofisarias de su misma especie y algunas veces a las de *Leptodactylus ocellatus* (L.) Gir., *Bufo D'Orbigny*, *Bufo marinus*, *Bufo paracnemis*.

6) La gonadotropina coriónica, en dosis altas, provocó la ovulación de *Bufo arenarum*.

7) No provocaron la ovulación del sapo *Bufo arenarum* Hensel las gonadotropinas de las hipófisis de mamíferos, aves, serpientes y peces, y orina de mujer embarazada, etc., ensayadas hasta hoy.

Agradecemos la generosa donación de los productos empleados a: Casa CIBA: desoxicorticosterona y testosterona; ESTRONA: estradiol y testosterona; ORGANON: testosterona; SCHERING: diferentes esteroides; SQUIBB: gonadotropina coriónica; UNIFA: gonadotropina suérica.

S U M M A R Y

1) The ovulation in *Bufo arenarum* Hensel takes place because sexual clasp produces secretion of pituitary gonadotrophin which gives rise to ovulation and deposition of eggs. When the *pars distalis* has been removed amplexus does not produce ovulation.

2) The properties of toads pituitary gonadotrophin are described as well as its: action under different conditions, time of disappearance from blood, seasonal changes, etc.

3) Operations on the tuber or pituitary can produce occlusion of the blood vessels of the *pars distalis*, reabsorption of gonadotrophin in the ischaemic areas and therefore ovulation and egg deposition.

4) Toad's gonadotrophin was active in the toad and in other batrachian females but was always inactive in mammals.

5) Gonadotrophins of mammaliāns, birds, snakes and fishes, the pregnancy urine did not produce ovulation in toads.

6) The female of *Bufo arenarum* only responds to the gonadotrophins of the same species and sometimes to those of *Leptodactylus ocellatus* (L.) Gir. and *Bufo D'Orbigny*. High doses of chorionic and pregnant mare serum gonadotrophins produces ovulation.

BIBLIOGRAFIA

1. *Allende, I. L. C. de*: Aparato sexual femenino del *Bufo arenarum*. S. de Amorrortu, 1938. — 1 (bis). *Allende, I. L. C. de, Orias, O.*: Rev. Soc. Arg. Biol., 1943, 19, 231. — 2. *Foglia, V. G.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1940, 16, 598. — 3. *Foglia, V. G.*: Endocrinology, 1941, 29, 503; Act. 2º Congr. Panamer. Endocrin. Montevideo, 1941. — 3 (bis). *Freire M. A.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1937, 13, 500; C. R. Soc. Biol., 1938, 127, 560. — 4. *Giusti, L., Houssay B. A.*: Rev. Asoc. Méd. Argent. 1922, 35, 42, (Soc. Biol., 3, 42); Rev. Cent. Estud. Agron., Bs. Aires, 1922, 15, Nº 106, 15. Rev. Med. Vet. Bs. Aires, noviembre 1922, 6, 6; C. R. Soc. Biol. Paris, 1922, 86, 1112. — 5. *Giusti, L., Houssay, B. A.*: Rev. Asoc. Méd. Argent., 1923, 36, 283, (Soc. Biol., 4, 77); C. R. Soc. Biol., 1923, 89, 739. — 6. *Giusti, L., Houssay, B. A.*: Rev. Asoc. Méd. Argent. 1924, 37, 155, (Soc. Argent. Biol., 5, 155). Rev. Med. Veter. Bs. Aires, agosto-setiembre 1924, 7, 177; C. R. Soc. Biol., Paris, 1924, 91, 313. — 7. *Houssay, B. A.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1943, 19, 182. — 8. *Houssay, B. A.*: New: Engl. J. Med., 1936, 214, 913; Bol. Acad. Med., Bs. Aires, 1936, 133. — 9. *Houssay, B. A., Biasotti, A., Sammartino, R.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1935, 11, 318; C. R. Soc. Biol., Paris, 1935, 120, 725. — 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. *Lascano González, J. M.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1935, 11, 309; C. R. Soc. Biol. 1940, 16, 581. — 14. *Masselin, J. N.*: Rev. Soc. Argent. Biol. 1940, 16, 35; C. R. Soc. Biol., Paris, 1940, 134, 289. — 15. *Mazzocco, P.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1940, 16, 129. — 16. *Mazzocco, P.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1932, 8, 454; C. R. Soc. Biol., Paris, 1932, 111, 474. — 17. *Novelli, A.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1932, 8, 459; C. R. Soc. Biol., Paris, 1932, 111, 476. — 18. *Novelli, A.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1942, 18, 238. — 19. *Novelli, A.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1942, 18, 238. — 20. *Pomerat, C. M.*: Alabama Acad. Science, 1940; J. Alabama Acad. Sci., 12, Part. II, 24-27. — 21. *Chapiro, H. A.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1943, 19, 187.

