

“ESTANDARIZACION DE LA UNIDAD SAPO EN EL DOSAJE DE GONADOTROFINAS CORIONICAS” *

CARLOS ROE GÓMEZ

Sección Bioquímica del Departamento de Investigaciones Médicas,
del Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública de Lima

(Recibido para su publicación el 13 de Diciembre de 1950).

INTRODUCCIÓN

Hasta hace pocos años, el dosaje de Gonadotrofinas Coriónicas en el laboratorio, requería un largo y laborioso trabajo a la vez que un costoso equipo.

Con los Estudios de GALLI MAININI, se abre un nuevo campo para la clínica e investigación, al hacer posible el dosaje hormonal en forma rápida y sencilla, usando el sapo macho como animal reactivo y siendo solamente necesario determinar la dosis mínima requerida por dicho bacetraco para producir liberación de espermatozoides.

Al tratar de dosar las hormonas Coriónicas Gonadotróficas según el método de GALLI MAININI, encontramos que, las diferentes cifras que dan los autores, como dosis mínima necesaria para producir el desprendimiento de los espermatozoides de la célula de Sertoli, y su consecutivo pasaje a la orina, son causas de error en la apreciación final de los resultados. Esta diferencia se puede deber, tanto a las distintas especies de animales usados (sapos), a la variabilidad biológica inherente a la población experimental, a los diversos productos tomados como patrón y a las técnicas empleadas. Este hecho nos ha llevado a tratar de determinar la dosis mínima capaz de producir reacción positiva en el 50 % de la población experimental, empleando el *Bufo spinulosus limensis* como animal tipo, siguiendo exactamente la técnica de GALLI MAININI y analizando matemá-

* Trabajo presentado a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para optar el Bachillerato en Medicina.

ticamente los datos experimentales obtenidos con diferentes productos hormonales, a fin de poder standarizar la Unidad Sapo, según el método estadístico de la Respuesta Cuantal de J. H. GADDUM usando la simplificación descrita por L. J. REED y H. MUENCH.

Hormonas hipofisarias. Desde los trabajos de ZONDECK y SMITH (1) (2) en 1926 y 1927, se sabe que el lóbulo anterior de la hipófisis elabora, entre otras muchas hormonas, dos, llamadas Gonadotróficas por la acción estimulante que poseen sobre las glándulas sexuales o gonadas. Estas hormonas, elaboradas por las células basófilas del lóbulo anterior son: una, la fracción foliculo maduradora, y, otra, la fracción luteinizante.

La primera, como su nombre lo indica, produce desarrollo y maduración de los folículos ováricos en la hembra y estimula el epitelio germinal en el macho; se le conoce también como F. S. H. (Follicle stimulating Hormona) o thylakentrin.

La segunda, produce en la hembra la maduración final del folículo, la ruptura, el estro y la transformación del folículo en cuerpo lúteo; mientras que en el macho asume un rol funcional sobre la célula intersticial o de Leyding y la secreción de testosterona; se le conoce también como I. C. S. H. (Interstitial Cell Stimulating Hormone) o L. H. (luteinizing hormone, o metakentrin).

Hasta hace pocos años, algunos autores opinaban que era una sola la hormona gonadotrófica y que sus diversas acciones biológicas se debían a las diferentes cantidades vertidas en el torrente circulatorio. Pero, en 1931, FEVOLD, HISAW y LEONARD (3), confirmaron que existen dos hormonas gonadotróficas en el lóbulo anterior, al hacer la separación por fraccionamiento químico.

En 1940 se aísla en estado puro la fracción I. C. S. H., mientras que la fracción F. S. H., si bien aún no ha sido aislada en estado puro, se le obtiene bastante purificada.

Estas hormonas producidas en la hipófisis pasan al torrente circulatorio y a la orina donde es posible ponerlas en evidencia.

Químicamente estas hormonas son moléculas proteicas complejas.

El Factor F. S. H. es normalmente excretado entre el cuarto y onceavo día del ciclo menstrual, y su acción termina cuando el folículo madura y se rompe.

Las cifras que dan los autores varían mucho, pero más o menos son de 250 u. r. (unidades rata), a 625 u. r. por litro de sangre y en la orina de 5 a 10 u. r. por litro a partir del sexto día y de 30 a 60 u. r. desde el onceavo al dieciseisavo día.

El factor I.C.S.H., es secretado entre los días 16 y 26 del ciclo y no hay datos precisos sobre las cantidades de este factor en los humores, (4).

Hormonas placentarias: ASCHEIM y ZONDECK, y FLUHMANN (5), encontraron que la orina y la sangre de la mujer gestante contenía una gran cantidad de hormona gonadotrófica, denominando "Prolán A" al factor folicular y "Prolán B" al factor luteinizante, pensando que dicha hormona provenía de la hipófisis. Esta afirmación fué desmentida poco después y se llegó a la conclusión, por una serie de trabajos, que esta hormona de la mujer gestante no era igual ni tenía el mismo origen que la hormona pituitaria y se le llamó hormona coriónica gonadotrófica (H. C.G.)

La pituitaria de los animales en gestación no contenía o contenía muy poca cantidad de H.C.G., mientras que la placenta contiene cantidades apreciables de esta hormona, en la misma época en que existen cifras elevadas en la sangre y orina; al mismo tiempo, la baja de producción de H.C.G. coincide con la desaparición de las células de Langhans de la placenta (6).

HIROSE, COLLIP y KIDO (7), usando las técnicas de implantación de trozos de placenta o por inyección de extractos de la misma, observaron las respuestas ováricas y uterinas positivas. Los mismos resultados obtuvieron con la inoculación en la cámara anterior del ojo de fragmentos de placenta.

La elevación del título de estas hormonas en sangre y orina en caso de Mola hidatiforme y Corioepitelioma (8), hacen también suponer el origen coriónico del H.C.G.

WISLOCKI y BENNETT (9), han demostrado que el citotrofoblasto es un tejido secretor.

De todos estos hechos, los autores llegan a la conclusión que la placenta es el sitio de origen de estas sustancias y no un mero depósito como se pensaba.

Propiedades: En lo que respecta a su acción biológica la Hormona Coriónica Gonadotrófica difiere tanto de la gonadotrofina pituitaria y de la gonadotrofina de la castración y menopausia, como de la hormona que elabora la placenta de la yegua preñada.

Las experiencias llevadas a cabo por EVANS (10) en ovarios de ratas inmaduras, demuestran que la H.C.G. produce poco aumento del peso de los ovarios en comparación con las otras citadas y que este aumento

de peso se debe a la acción estimulante que ejerce esta hormona sobre la pituitaria, a la que estimularía elaborar el factor F.S.H. Lo que lleva a la conclusión que H.C.G. es una hormona incompleta en el sentido que posee muy poco o no posee factor F.S.H.

Administrando H.C.G. a ratas machos hipofisectomizados, mantiene el epitelio seminífero y normaliza o exagera la función de las células intersticiales (10).

El H.C.G. es, pues, semejante al factor I.C.S.H. aunque difieren en algunos puntos, en especial en el hecho que H.C.G. actúa como si fuera una hormona gonadotrófica completa, porque estimula la producción de F.S.H., mientras que el factor I.C.S.H. es incapaz de esta acción.

La potencia de H.C.G., como estimulante de las células intersticiales, es mucho mayor que la I.C.S.H. y provoca en la rata macho mayor producción de hormonas masculinas (6).

Estas dos hormonas difieren también en la respuesta producida en otros animales (6).

Hormona de la castración y menopausia: ASCHEIM y ZONDECK (1), y FLUHMANN (11), hicieron notar el incremento de sustancia gonadotrófica en la orina de mujeres y hombres en la castración y menopausia. La concentración de esta hormona en la orina es muy pequeña, razón por la cual los estudios experimentales sobre esta hormona no han avanzado mucho. El título en orina se piensa que está alrededor de 5 M.U.U. (Mouse Uterin Unit) en 24 horas. Se inicia de 6 a 10 días después de la castración y se mantiene indefinidamente.

Sus efectos, en contraste con el H.C.G., son folículo estimulantes. El factor, pues, exclusivo de esta hormona es el F.S.H.

El efecto en ratas machos hipofisectomizados es preservando el epitelio seminífero de la atrofia, sin afectar las células intersticiales y órganos de reproducción accesorios (6).

Hormona gonadotrófica del suero equino: COLE y HART, en 1934 (12), encontraron que el suero de la yegua preñada contenía una hormona Gonadotrófica, hormona que aparece alrededor del 37° al 43° día, con un título, al principio de 60 a 100 u.r. por litro, para elevarse a 50.000 u.r. a los 50 días más o menos, y comenzar a declinar hasta alcanzar menos de 50 u.r. alrededor de los 200 días de la preñez (la implantación del blastociste en la yegua ocurre alrededor de 40 día de la fecundación, y la gestación dura de 330-350 días).

Según CATCHOPOL y LYONS (13) esta hormona, a semejanza de la H.C.G., se origina en el tejido coriónico y se encuentra en muy poca cantidad en la orina de la yegua, mientras que es abundante en el suero, probablemente por su incapacidad para pasar el filtro renal, a diferencia de la H.C.G., que rápidamente, desaparece del torrente sanguíneo para ir a la orina.

La acción de esta hormona sobre los animales inmaduros es doble, es decir, produce estimulación folicular y tiene efecto luteinizante. El efecto predominante observado en las ratas hipofisectomizadas es foliculo estimulante, o sea, predomina el factor F.S.H., lo que la diferencia de la hormona placentaria humana que tiene casi exclusivamente factor, I.C.S.H.

Tiempo de aparición de H.C.G. en la orina de mujeres gestantes.
Diagnóstico del embarazo: La implantación del huevo humano ocurre alrededor de las dos semanas de la fecundación, ASCHEIM y ZONDECK (14), encontraron H.C.G. en orina dos semanas después de la primera falla menstrual. Sin embargo, los trabajos de LEVIN (15) y las técnicas de dosaje mejoradas, permiten afirmar que la gonadotropina coriónica aparece en la orina entre el 10º y 20º día después de la ovulación; o también entre el 4º día precedente y el 8º siguiente a la primera falla menstrual. La relación que hay entre la cantidad de hormona sérica y urinaria es de 1 a 10.

Las gonadotropinas coriónicas no sólo se encuentran en la orina y la sangre, sino también en la saliva, líquido céfalo-raquídeo, sudor, líquido amniótico y jugo gástrico (10).

El descubrimiento de estas hormonas, permitió que ASCHEIM y ZONDECK idearan la forma de ponerlas en evidencia en la orina de la mujer gestante con la cual se hacía el diagnóstico precoz del embarazo; esta prueba toma como punto de referencia la formación de cuerpos lúteos y folículos hemorrágicos en los ovarios de pericotes y ratas, 96 horas después de la inyección de orina.

Posteriormente a esta prueba diagnóstica se han sumado otras muchas, basadas todas ellas en el predominio del factor I.C.S.H. en la hormona Coriónica Gonadotrófica, así como en la acción estimuladora que sobre la hipófisis tiene dicha hormona. Entre estas pruebas tenemos:

El test de Friedman: Formación de cuerpo lúteo en coneja inmadura o madura y aislada, 24 horas después de la inyección de la orina.

El test de Bendick: Ovulación en pericote hembra madura, después de 18 horas de una inyección de orina.

El frotis vaginal en ratas inmaduras, después de 72-93 horas de la inyección de orina.

La hipertrofia uterina en ratas inmaduras.

Y, por último, los tests usando batracios como animal reactivo entre los cuales tenemos, la ovulación en la rana, 6 a 18 horas después de la inyección de orina y la reacción de GALLI MAININI que se basa en el desprendimiento de espermatozoides en el sapo y su observación en la orina.

Todas estas pruebas, usadas para el diagnóstico precoz del embarazo, pueden, asimismo, ser usadas por el dosaje de Gosadotrofinas, dosaje cuya importancia clínica está demás recalcar.

Unidades: Los efectos de la hormona H.C.G. sobre los diversos órganos sexuales han sido usados para establecer las unidades, es decir, los valores normales y sus desviaciones.

Estas unidades varían, como es de suponer, según el animal usado, y aún con el mismo animal según los diferentes puntos de vista tomados para apreciar los resultados. Así tenemos, unidad rata, unidad pericote, unidad útero pericote, unidad conejo, unidad internacional, unidad sapo, etc.

Es, sin embargo, difícil hacer la comparación de estas diferentes unidades por la variedad de factores que intervienen en su determinación. Así, las distintas técnicas de extracción y purificación de H.C.G., la diferente reacción de los animales, el sitio de la inyección, el punto de vista tomada para hacer la apreciación, el peso de un ovario o de dos, el frotis vaginal, o la determinación de folículos, etc., son factores de confusión en la apreciación final de los resultados.

Estas razones llevaron a la Liga de las Naciones, en 1939, a adoptar una Unidad Internacional que se define como la actividad gonadotrófica coriónica (16).

Dosaje de Gonadotrofinas: En 1947, GALLI MAININI (17), basándose en los trabajos de HOUSSAY y LASCANO GONZÁLEZ y D. ROBERTIS, BURGOS y BREYTES (13), propone una reacción, para el diagnóstico precoz del embarazo, que se basa en la liberación de espermatozoides en los tubos seminíferos del sapo macho, de donde pasan a los conductos eférentes que se comunican en estos animales con el riñón; en esta forma, es posible encontrarlos en la orina de la cloaca a las dos o tres horas de realizada la inoculación.

Encuentra también, dicho autor, que la inyección de orina de hom-

bres y mujeres en estado normal, así como la orina de la mujer menopáusicas y de hombres de más de 60 años, no produce reacción positiva. Los mismos resultados negativos se obtiene con una serie de hormonas sexuales y con enfermos de ciertas endocrinopatías.

Todo esto pues, parece indicar que el factor que produce la reacción es el I. C. S. H., que está en mayor proporción en la orina de la mujer gestante que en la de la mujer menopáusicas. Por la misma razón, la cantidad de hormona sérica de yegua preñada, necesaria para producir reacción, es mucho mayor que la de orina de mujer gestante, como veremos más adelante.

El uso de la reacción de GALLI MAININI, que rápidamente se ha extendido y generalizado por la sencillez y seguridad de su resultado, hizo pensar en la posibilidad de hacer el análisis cuantitativo de las gonadotrofinas coriónicas en forma rápida y sencilla, siendo necesario solamente, determinar la dosis mínima capaz de producir la liberación de los espermatozoides en el sapo y sobre esa base, hacer inoculaciones con diferentes diluciones de orina en varios animales, siendo posible, con un simple cálculo determinar con exactitud la cantidad de hormona presente.

Fué el mismo GALLI MAININI el primero quien, usando como animal tipo el Bufo arenarum Hensel, determinó que la dosis mínima de gonadotrofinas coriónicas humanas (H. C. G.) necesaria para obtener respuesta en la mayor parte de los sapos era de 40 u. i. (unidades internacionales).

Posteriormente, una serie de autores han encontrado cifras diferentes, así:

BURGOS y MAININI (19) (20) dan resultados negativos con	30 U. I.
HOUSSAY (21) da resultados negativos con	10 U. I.
PINTO y SUER (21) da resultados negativos con	10 U. I.
GALLI MAININI (17) da resultados positivos con	40 U. I.
HASKINS y SHERMAN (23) dan resul. posit. en el 75 % con	35 U. I.
HASKINS y SHERMAN dan result. posit. en el 100 % con . .	70 U. I.
SCHWITZER y BAS (24) dan resultados positivos con	38 U. I.
SCHWITZER y BAS usando el suero de yegua preñada, dan resultados positivos con	150 U. I.
SAN MARTÍN y ZORRILLA (25) dan resultados positivos con	10 U. I.

Estas diferencias, según SCHWITZER (26), se deben a varios factores:

- a) Al bajo número de animales empleados por algunos autores.
- b) Los distintos orígenes de las hormonas utilizadas.
- c) Las diferentes condiciones de ensayo, especialmente la técnica de inyección, temperatura del ambiente y condiciones de luz.
- d) Porque falta hasta ahora una definición del valor umbral, de manera que algunos autores entendían como tal, cantidades de hormonas que daban reacciones negativas, mientras que otros tomaban como límite inferior, valores de gonadotrofina coriónica que casualmente daban a bajo nivel reacciones positivas.

De ahí que este autor propone la creación de la unidad sapo (U.S.) que la define como la dosis mínima necesaria para provocar una respuesta positiva en las dos terceras partes del número de sapos adultos usados en condiciones adecuadas (26).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material: Hemos usado en nuestro estudio, alrededor de 420 sapos machos (*Bufo Spinolosus Limensis*), capturados en Lima y alrededores, con un peso promedio de 117.5 grs. que fructuaba entre 90 y 140 grs.

Como patrones, hemos ensayado todos los productos comerciales de Gonadotrofinas Coriónicas que existen actualmente en plaza, unas de origen humano y otras de origen equino, tituladas en Unidades Internacionales (U.I.) con excepción de dos: el Gonadogen en Unidades Castle-Nelson, cuya equivalencia aproximada en U.I. es: 1 U.C.N. = 20 U.I.; y el Prolán, titulado en Unidades Rata (U.R.) cuyo origen y equivalencia no está indicada, pero que es posible determinar como veremos más adelante.

Los productos que hemos ensayado son:

Gonadotrofina Coriónica de origen humano	{ Apoidina Pranturón
Gonadotrofinas Coriónicas de origen equino	{ Anterón A.P.L. Gonadogen Pregnil Prolán

Desgraciadamente, no nos ha sido posible obtener en Lima, Foluteina, que ha dado resultados diferentes a los obtenidos por nosotros (25).

Método: La técnica seguida para la inoculación, ha sido la recomendada por GALLI MAININI (17), o sea, la inyección del producto, en los sacos linfáticos laterales del sapo macho. La forma como hemos procedido para el desarrollo del trabajo, ha sido la siguiente:

Se efectuaron ensayos preliminares de tanteo, para determinar la cantidad aproximada de Gonadotrofina Coriónica capaz de producir respuesta biológica positiva, empleando para ello dos animales para cada una de las seis diluciones ensayadas en cada producto. Estas diluciones las hicimos basándonos en las diferentes cifras que dan los autores, como dosis mínima, capaz de dar respuesta biológica positiva.

Una vez determinado con aproximación este valor, y con el fin de restringir el error experimental por muestreo, los sapos fueron seleccionados al azar y divididos en 7 grupos de 50 animales cada uno. Del mismo modo, se seleccionaron al azar los animales de cada grupo, para la administración de las diferentes dosis de Gonadotrofinas Coriónicas investigadas.

Las diluciones de los productos hormonales se hicieron todas en agua destilada y en forma tal que todos los animales recibieron un mismo volumen, 6 centímetros cúbicos.

La población experimental de sapos fué mantenida durante el tiempo que duraron las observaciones, bajo idénticas condiciones de vivienda (bocales de vidrio con capacidad para acomodar 8 sapos con una delgada capa de agua de caño en el fondo, para favorecer la humedad de la piel en los animales y mantener una atmósfera de saturación constante) y sin recibir alimentación.

La investigación de la respuesta biológica (aparición de espermatozoides en la orina de la cloaca) se practicó, a las dos, seis y 24 horas después de la inoculación.

Hemos considerado de valor ilustrativo, incluir en los resultados la cantidad aproximada de espermatozoides en cada caso, para ello, hemos contado el número de espermatozoides por campo y enumeramos las respuestas de 1 a 4, que corresponden arbitrariamente:

- | | | | | |
|---|-------------|-----------------|-----|-------|
| 1 | de 1 a 10 | espermatozoides | por | campo |
| 2 | de 10 a 30 | .. | .. | .. |
| 3 | más de 30 | .. | .. | .. |
| 4 | incontables | .. | .. | .. |

Los resultados obtenidos se consignan en los siguientes cuadros:

APOIDINA
Cuadro resumen

Unidades inoculadas (U.I.)	Nº de anima- les	Resultados					Positivo %
		Positivos			Negativo		
		2 h.	6 h.	24 h.			
10	10	1	0	0	9	10	
20	10	0	0	0	10	0	
30	10	2	1	0	8	20	
40	10	6	4	4	4	60	
45	10	10	9	1	0	100	

PRANTURON
Cuadro resumen

Unidades inoculadas (U.I.)	Nº de anima- les	Resultados					Positivo %
		Positivos			Negativo		
		2 h.	6 h.	24 h.			
10	10	2	0	0	8	20	
20	10	2	0	0	8	20	
30	10	3	1	0	7	30	
40	10	9	9	4	1	90	
45	10	10	8	3	0	100	

ANTERON
Cuadro resumen

Unidades inoculadas (U.I.)	Nº de anima- les	Resultados					Positivo %
		Positivos			Negativo		
		2 h.	6 h.	24 h.			
50	10	0	0	0	10	0	
60	10	2	0	0	8	20	
70	10	4	4	0	6	40	
80	10	6	4	2	6	60	
90	10	9	5	3	1	90	

PREGNIL
Cuadro resumen

Unidades inoculadas (U.I.)	Nº de anima- les	R e s u l t a d o s					Positivo %
		P o s i t i v o s			Negativo		
		2 h.	6 h.	24 h.			
70	10	0	0	0	10	0	
80	10	1	1	0	9	10	
90	10	5	1	0	5	50	
95	10	9	7	2	1	90	
100	10	10	9	4	0	100	

GONADOGEN
Cuadro resumen

Unidades inoculadas (U.I.)	Nº de anima- les	R e s u l t a d o s					Positivo %
		P o s i t i v o s			Negativo		
		2 h.	6 h.	24 h.			
60	10	2	0	1	7	30	
70	10	2	1	1	7	30	
90	10	5	3	0	4	60	
80	10	8	7	1	2	80	
100	10	10	9	5	0	100	

A. P. L.
Cuadro resumen

Unidades inoculadas (U.I.)	Nº de anima- les	R e s u l t a d o s					Positivo %
		P o s i t i v o s			Negativo		
		2 h.	6 h.	24 h.			
50	10	4	2	0	5	50	
60	10	3	1	1	6	40	
70	10	6	4	1	4	60	
75	10	8	5	2	9	10	
80	10	9	8	1	4	100	

PROLAN
Cuadro resumen

Unidades inoculadas	Nº de anima-	R e s u l t a d o s				
		P o s i t i v o s			Negativo	Positivo %
(U.I.)	les	2 h.	6 h.	24 h.		
60	10	1	1	0	8	20
70	10	3	2	0	6	40
80	10	2	2	0	7	30
90	10	6	6	1	4	60
100	10	9	8	2	1	100

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los datos consignados en los cuadros que anteceden, han sido sometidos a un análisis matemático-estadístico, siguiendo los conceptos de J. H. GADDUM, para el análisis de universos experimentales finitos (27), empleando la simplificación práctica de REED y MUENCH (28) para el análisis de poblaciones experimentales con respuesta Cuantal.

Vamos a ilustrar con un ejemplo la confección de los cuadros analíticos que siguen; tomemos el primer cuadro, *Apoidina*:

Los cuatro primeros casilleros horizontales, son los datos recogidos del experimento. Para la elaboración del quinto casillero, donde dice Total de Positivos, ponemos en la primera columna vertical (10 U.I.), 1, que corresponde al número de respuestas positivas con 10 U.I.; en la segunda columna vertical, adicionamos al número de respuestas positivas de la primera columna, los de la segunda ya que un sapo que reacciona positivamente con 10 U.I., también lo hará con 20 u.i.; en la tercera columna sumamos los resultados positivos de la primera, segunda y tercera columna, y, así, sucesivamente.

Para la confección del sexto casillero, donde dice Total de Negativos, seguimos el mismo principio:

En la primera columna vertical ponemos 31, que representa la suma de todos los resultados negativos, ya que un sapo que reacciona negativamente con 20, 30 ó 40 U.I., también lo hará con 10 U.I.; en la segunda columna (20 U.I.) ponemos 22, que representa la suma de los resultados negativos con 20, 30 40 y 45 U.I., y, así, sucesivamente.

El porcentaje de positivos, se obtiene de la suma total de positivos y negativos en cada columna.

Siguiendo con el mismo ejemplo, la dosis que produzca respuesta positiva en el 50 % de los animales, debe estar entre la que produce el 20 % (30 u.i.) y la que produce 68 % (40 u.i.)

A fin de facilitar la interpolación matemática para obtener el 50 % de reacción biológica en la población experimental, hemos empleado un método gráfico, usando papel semi-logarítmico para el "ploteo" de las dosis y las respuestas porcentuales. En la ordenada, ponemos las unidades en escala logarítmica y en la absisa, los porcentajes de positivos, en escala aritmética. Siguiendo siempre el mismo ejemplo, tomamos los dos puntos extremos entre los cuales se encuentra el 50 % que, en este caso, son: 20 % con 30 u.i. por un lado, y 68 % con 40 u.i. por el otro. Marcamos estos dos puntos en el papel y los unimos con una línea recta. La altura a la cual esta recta corta a la ordenada de 50 %, indica el número de Unidades Internacionales que produce reacción positiva en el 50 %, de los animales inoculados.

Como se puede apreciar, al emplear la derivación logarítmica de las dosis, se obtiene una curva de primer grado, la que es fácilmente extrapolada en ambos extremos.

APOIDINA

Unidades	10 u.i.	20 u.i.	30 u.i.	40 u.i.	45 u.i.
Número de sapos	10	10	10	10	10
Nº respuestas positivas	1	0	2	6	10
Nº respuestas negativas	9	10	8	4	0
Total de Positivos	1	1	3	9	19
Total de Negativos	31	22	12	4	0
Porcentaje de positivos	3.1	4.3	20	68	10.0

PRANTURON

Unidades	10 u.i.	20 u.i.	30 u.i.	40 u.i.	45 u.i.
Número de sapos	10	10	10	10	10
Nº respuestas positivas	2	2	3	9	10
Nº respuestas negativas	8	8	7	1	0
Total de Positivos	2	4	7	16	26
Total de Negativos	24	16	8	1	0
Porcentajes de positivos	7.6	20	46	94	100

ANTERON

Unidades	50 u.i.	60 u.i.	70 u.i.	80 u.i.	85 u.i.
Número de sapos	10	10	10	10	10
Nº respuestas positivas	0	2	5	6	9
Nº respuestas negativas	10	8	5	4	1
Total de positivos	0	2	7	13	22
Total de negativos	28	18	10	5	1
Porcentaje de positivos	0	10	41	72.2	95.6

A. P. L.

Unidades	60 u.i.	70 u.i.	80 u.i.	90 u.i.	100 u.i.
Número de sapos	10	10	10	10	10
Nº respuestas positivas	3	3	6	8	10
Nº respuestas negativas	7	7	4	2	0
Total de positivas	3	6	12	20	30
Total de negativas	20	13	6	2	0
Porcentaje de positivos	13	31.5	66.6	90.9	100

PREGNIL

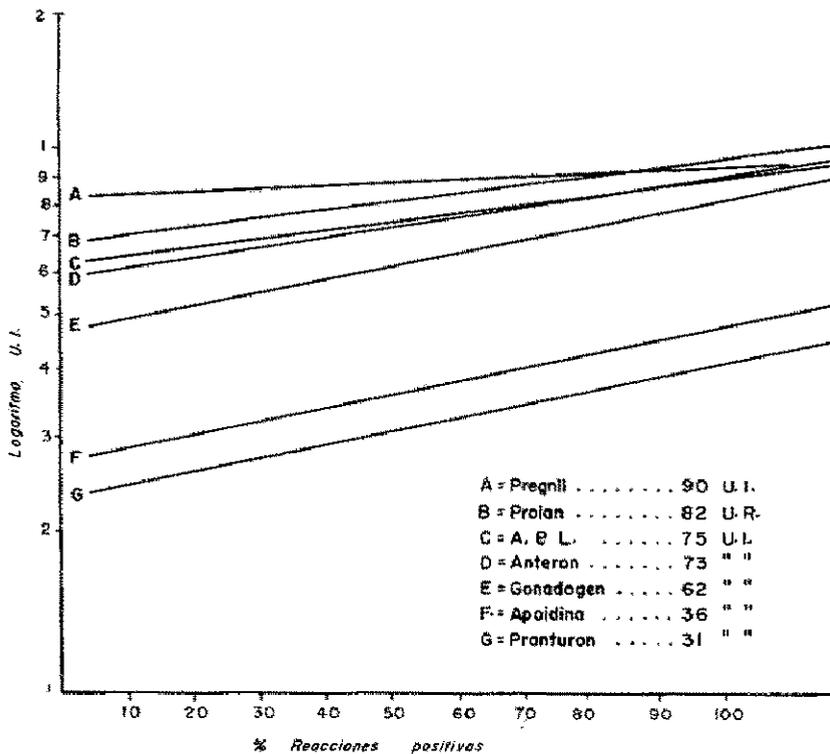
Unidades	70 u.i.	80 u.i.	90 u.i.	95 u.i.	100 u.i.
Número de sapos	10	10	10	10	10
Nº respuestas positivas	0	1	5	9	10
Nº respuestas negativas	10	9	5	1	0
Total de positivos	0	1	6	15	25
Total de negativos	25	15	6	1	0
Porcentaje de positivos	0	6.2	50	93	100

GONADOGEN

Unidades	50 u.i.	60 u.i.	70 u.i.	75 u.i.	80 u.i.
Número de sapos	10	10	10	10	10
Nº respuestas positivas	5	4	6	9	9
Nº respuestas negativas	5	6	4	1	1
Total de positivos	5	9	15	24	33
Total de negativos	17	22	6	2	1
Porcentaje de positivos	22.7	42.8	71.4	92.3	97

PROLAN

Unidades	60 u.i.	70 u.i.	80 u.i.	90 u.i.	100 u.i.
Número de sapos	10	10	10	10	10
Nº respuestas positivas	2	4	3	6	9
Nº respuestas negativas	8	6	7	4	1
Total de positivos	2	6	9	15	24
Total de negativos	26	18	12	5	1
Porcentaje de positivos	7.1	25	42.8	75	96



Gráfica 1

DISCUSIÓN

El criterio para determinar el valor de una respuesta biológica, según los conceptos modernos del Bidosaje, está dado por la dilución de la droga investigada con la que reacciona cierta proporción de la población experimental. La ventaja de emplear aquella dilución con que reacciona la mitad (50 % de los animales, ha sido ampliamente demostrada por GADDUM (27) sobre firmes bases farmacológicas.

El criterio de respuesta biológica, como la reacción del 50 % de una población experimental, es menos afectado por el error de variabilidad biológica inherente a un universo finito, que cualquier otro concepto cuantitativo. En este sentido, como indica REED y MUENCH (28), el peor criterio que pueda guiar al experimentador es tomar como base de reacción biológica la respuesta del 100 % de una población experimental.

Esta es la razón por la que hemos seleccionado el análisis estadístico, antes descrito con el fin de standarizar la Unidad Sapo, para que

sirva como punto de referencia seguro en nuestro medio, en el dosaje de Gonadotrofinas Coriónicas.

Los valores dados por los diferentes autores a la dosis mínima de Gonadotrofina Coriónica, capaz de dar respuesta positiva en el Sapo Macho, varían, como hemos visto en un amplio margen así:

BURGOS y MANCINI	20 U.I.
HASKINS y SHERMAN	35 U.I.
GALLI MAININI	40 U.I.
SAN MARTÍN y ZORRILLA	10 U.I.

Sabemos también las causas que producen esta variedad en los resultados:

- Bajo número de animales empleados en las determinaciones.
- Distintos orígenes de las hormonas empleadas.
- Diferentes condiciones de ensayo.
- Diferente especie de animal usado (sapo).
- Falta de la definición del valor umbral.

Hemos tratado de subsanar todas estas posibilidades de variación para lo cual empleamos:

- 420 animales
- 7 productos hormonales de 2 orígenes diferentes.
- La técnica de GALLI MAININI.
- El sapo de Lima y alrededores (*Bufo Spinolosus Limensis*).
- Definimos la Unidad Sapo, como la dosis mínima requerida para producir reacción positiva en el 50 % de la población experimental.

Nuestros resultados son:

Hormonas Coriónicas de origen humano	{	Apoidina	—	36 U.I.
		Pranturón	—	31 U.I.
Hormonas Coriónicas de origen equino	{	Anterón	—	73 U.I.
		A. P. L.	—	75 U.I.
		Gonadogen	—	62 U.I.
		Pregnil	—	90 U.I.
		Prolán	—	86 U.I.

Vemos, a simple vista, que los resultados se pueden ordenar en dos grupos: uno, de las hormonas Gonatróficas de origen humano, que dan valores muy semejantes; y el otro, de las hormonas de origen equino, que, si bien difieren en alguna forma, es posible considerarlas en un solo grupo.

Vemos también que las hormonas de origen humano, son 2 y 3 veces más potentes que las de origen equino, hecho este que se explica por la mayor cantidad de factor I.C.S.H. que poseen, factor que es el que produce la vacuolización de las células de Sértoli y, por consiguiente, la liberación de espermatozoides.

Hay que tener en cuenta que el Gonadogen está titulado en Unidades Castle-Nelson y la equivalencia en Unidades Internacionales es aproximada; no sabemos si esto explicaría la diferencia con las otras hormonas.

Entre los productos usados, el Prolán no tiene indicado ni el origen de la hormona, ni la equivalencia de sus unidades rata. Este hecho nos sugiere otra de las ventajas de la standarización de la Unidad Sapo, lo que permite determinar el origen y potencia de cualquier Hormona Gonadotrófica Coriónica en forma rápida y sencilla. Así hicimos las correspondientes inoculaciones del Prolán y los resultados encajan en el grupo de las Gonadotrofinas Coriónicas de origen equino, mientras que su unidad rata equivale aproximadamente a una unidad internacional.

La Unidad Sapo, pues, equivale en las Hormonas Coriónicas de origen humano a 31 u.i.; mientras que en las Hormonas Coriónicas de origen equino equivale a 73 u.i. La representación gráfica-matemática de los resultados obtenidos puede apreciarse claramente en el gráfico N° 1, el que ilustra a simple vista los conceptos y conclusiones sugeridos por nuestro estudio.

Naturalmente que no pretendemos dar un valor invariable a esta Unidad, ya que sólo hemos usado algunos productos comerciales. Pero el número de animales que hemos empleado, y el hecho que tanto las Gonadotrofinas de origen humano como las de origen equino produzcan reacciones semejantes, nos hace pensar que estamos cerca de la cifra verdadera.

En la investigación de espermatozoides en la orina de los sapos encontramos proporción entre la cantidad de espermatozoides y la dosis inyectada, cuanto mayor era ésta, mayor era la intensidad de la respuesta.

La gran mayoría de los animales que dieron respuesta positiva, lo hicieron a las dos horas, algunos respondieron recién a las 6 horas y sólo 2 a las 24 horas.

Los sapos que dieron respuesta positiva a las dos horas, en su casi

totalidad, eran negativos a las seis horas y muy pocos llegaron positivos a las 24 horas; éstos eran generalmente los que dieron reacciones más intensas.

Algunos animales respondieron en forma positiva a dosis muy bajas de hormona; probablemente estos animales han estado en celo, y la investigación previa de espermatozoides no lo puso en evidencia.

SUMARIO Y CONCLUSIONES

1ª El dosaje de Gonadotrofinas Coriónicas, siguiendo la técnica de GALLI MAININI, es una sencilla y rápida prueba de laboratorio, cuya importancia clínica está demás recalcar.

2ª Para poder realizar el dosaje de Gonadotrofinas Coriónicas, siguiendo la técnica citada, es necesario conocer la dosis mínima capaz de producir respuesta biológica positiva, en el sapo macho.

3ª Los valores dados a esta cifra, varían según los diferentes autores, y esta variación se debe:

- a) Al bajo número de animales empleados.
- b) A las diversas técnicas empleadas.
- c) A los diferentes patrones usados.
- d) A la falta de un valor umbral.

4ª Hemos tratado de eliminar estas posibilidades de error, para determinar en el Sapo Macho (*Bufo Spinolosus Limensis*) de Lima y alrededores, la dosis mínima capaz de producir respuesta biológica positiva, empleando 420 animales, usando como patrones todos los productos comerciales de Gonadotrofinas Coriónicas que hay en plaza y siguiendo exactamente la técnica de GALLI MAININI.

5ª Analizando los resultados obtenidos con criterio estadístico, aplicando los conceptos desarrollados por J. H. GADDUM, sugerimos definir la dosis mínima como aquella capaz de producir respuesta biológica positiva en el 50 % de la población experimental.

6ª Sugerimos tomar este dato como valor umbral, definiendo la Unidad Sapo como: "la dosis mínima capaz de producir respuesta biológica positiva en el 50 % de la población experimental".

7ª Hemos encontrado que la Unidad Sapo (U.S.), en el Bufo Spinolosus Limensis de Lima y alrededores, equivale a:

31 Unidades Internacionales (U.I.) para las hormonas Gonadotróficas Coriónicas de origen humano; y

73 Unidades Internacionales (U.I.) para las hormonas Gonadotróficas Coriónicas de origen equino.

8ª Desarrollamos un método gráfico-matemático sencillo y práctico que permite hallar rápidamente el valor de la Unidad Sapo (U.S.) y que a la vez hace posible determinar el origen y equivalencia de cualquier hormona Gonadotrófica Coriónica.

9ª Sugerimos que se emplee este método para futuras determinaciones del valor de la Unidad Sapo (U.S.), empleando una preparación standard de Gonadotrofinas Coriónicas tal, como la recomendada por el Comité de la Liga de las Naciones (17).

BIBLIOGRAFÍA

1. ALLEN, E., DANFORTH, C. H. y DOYSY, E.: Sex and Internal Secretions. The Williams Winkins Company, Baltimore, 1948.
2. SMITH, P. E.: *J. A. M. A.* 88: 158, 1927.
3. FEVOLD, H. L., HISAHW, F. L. y LEONARD, S. L.: *Am. Jour. Phys.* 97: 291, 1931.
4. WOLF, W., Endocrinología en la práctica moderna. W. B. Saunders Comnay Phyladelphia and London, 1937.
5. FLUHMANN, C. F.: *J. A. M. A.* 93: 672 y 1136, 1929.
6. PINCUS, C. y THIMAN, K.: The Hormones. Vol. II. Academic Press Inc. Publishers. New York, 1948.
8. ZORRILLA, T. O.: Excreción de Gonadotrofinas Coriónicas en el Embarazo normal, Mola Hitadiforme y Corio Epitelioma. Tesis, Fac. Med. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 1950.
9. WISLOCKI, G. B. y BENNET, H. S.: *Am. Jour. Anat.* 73: 355, 1943.
10. EVANS, H. N. y SIMPSON, M. E.: *Am. Jour. Phys.* 89: 371, 1929.
11. FLUHMANN, C. F.: *Endocrinology.* 15: 177, 1931.
12. COLE, H. H. y HART, G. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 32: 370, 1934.
13. CATCHPOLE, H. R. y LYONS, W. R.: *Am. Jor. Anat.* 55: 167, 1934.

14. PINCUS, G. and THIMAN, K.: *The Hormones*. Vol. II. Academic Press Inc. Publisher New York, 1948.
15. LEVIN, L.: *Endocrinology*, 28: 378, 1941.
16. LEAGUE of Nations: *Quart. Bull. Health Organisation League of Nations* 8: 884, 1939.
17. GALLI MAININI, C.: *La Semana Médica* 12: 337; 38: 447, 1947.
18. DE ROBERTIS, E., BURGOS, M. H. y BREYTER, E.: *Rev. Soc. Arg. Biol.* 12: 369, 1945.
19. BURGOS, M. H. y MANCINI, R. E.: *Rev. Soc. Arg. Biol.* 33: 154, 1947.
20. BURGOS, M. H. y MANCINI, R. E.: *Rev. Soc. Arg. Biol.* 34: 328, 1948.
21. Citado por SCHEWITZER y BAS, J.: *La Semana Médica*, 45: 980, 1948.
22. PINTO, R. M. y SUER, H. J.: *La Prensa Médica Arg.*, 4: 165, 1948.
23. HASKINSK, A. L. y SHERMAN, A. I.: *Endocrinology*, 44: 542, 1949.
24. SCHEWITZER, E. y BAS, J.: *La Semana Médica*, 40: 703, 1948.
25. SAN MARTÍN, M. y ZORRILLA, T.: *Rev. Fac. Med. Vetr.* 4: 50, 1949
26. SCHEWITZER, E. y BAS, J.: *La Semana Médica*, 45: 980, 1948.
27. GADDUM, J. H.: *Med. Res. Council London Special Report Series* N° 183., 1933.
28. REED, L. J. y MUENCH, H.: *Am. Jour. Hyg.* 27: 3, 1938.