

## Reacción Cuantitativa de la Rana Macho «Rana Pipiens» a la Acción de Gonadotrofina Coriónica (\*)

Cecilia Hartmann Perdomo y C. W. Chapman. (Escuela de Farmacia. Universidad de Maryland. Baltimore 1, Maryland, U. S. A.).

Se ha demostrado que gonadotrofinas de diferente origen producen desprendimiento de espermatozoides en el testículo del sapo macho *Bufo arenarum Hensel* (4).

El conocimiento de esta acción fisiológica lo aplicó Galli Mainini en el diagnóstico precoz de embarazo (3).

Efecto análogo se ha observado en la rana macho *Rana pipiens* con la inyección de lóbulo anterior de la hipófisis (6) y se ha comprobado el valor diagnóstico de este animal para el mismo tipo de reacción (8, 5).

El presente trabajo se hizo con el objeto de determinar algunos factores relacionados con el uso de la rana macho *Rana pipiens* como animal reactivo en la determinación cuantitativa de la actividad de gonadotrofina coriónica.

El procedimiento consistió en inyectar varios grupos de ranas con dosis graduales de la hormona para investigar la cantidad mínima de gonadotrofina coriónica necesaria para producir desprendimiento de espermatozoides; el tiempo transcurrido después de la inyección en que se produce la reacción máxima; la uniformidad y sensibilidad de los animales con la inyección repetida de la hormona.

### Parte Experimental.

*Animales empleados:* La rana macho *Rana pipiens*. Las ranas

---

(\*) Presentado a la Sociedad Argentina de Biología el 1º de septiembre de 1949.

fueron recogidas durante la primavera en Oshkosh, Wisconsin, U. S. A., y se guardaron a 10° C. Al llegar al laboratorio se guardaron en un tanque a temperatura entre 19° y 21.5°C. Se escogieron las ranas que pesaban entre 10 y 30 gramos y se colocaron en compartimientos individuales por lo menos dos días antes de usarlas. Estos animales se guardaron en la oscuridad, en poca agua y sin alimento por un período de tres meses a una temperatura de 20°C y se usaron cinco veces.

*Material:* Se empleó gonadotrofina coriónica (\*) que contenía 5000 unidades internacionales por ampolleta. El mismo lote de hormona se utilizó en todos los experimentos, excepto para el quinto, en los grupos G. y H.

*Preparación de las soluciones:* Se prepararon soluciones de 500 unidades internacionales por centímetro cúbico, disolviendo el contenido de gonadotrofina de las ampolletas en 10 centímetros cúbicos de diluyente (éste contiene 0.5 por 100 de fenol) y se guardaron por dos semanas a 30°C. A partir de las soluciones primitivas se prepararon otras más diluídas que contenían entre 2 y 50 unidades por centímetro cúbico. Las soluciones finales se emplearon una sola vez y siempre se prepararon el mismo día del experimento.

*Eliminación espontánea de espermatozoides:* Previa observación indicó la ausencia de espermatozoides en la orina de los animales empleados en estos experimentos. Un lote de ranas se observó por un período de seis días consecutivos (7 a 12 de febrero), los resultados siempre fueron negativos. En otro grupo de 100 ranas, 10 mostraron presencia ocasional de espermatozoides (se anotó como "ocasional" a la presencia de 1 a 4 espermatozoides en un campo microscópico y observados con poco aumento). Otro grupo, compuesto de 12 animales, dió resultados negativos después de inyectarles 1 cm<sup>3</sup> de agua destilada.

La presencia "ocasional" de espermatozoides después de la inyección de gonadotrofina se considera una reacción negativa en este trabajo. Un resultado es positivo cuando se encuentran muchos (20 o más) espermatozoides en el campo microscópico observados con poco aumento.

*Procedimiento:* Cada grupo experimental de 40 a 50 ranas se dividió en grupos más pequeños compuestos de 10 o 15 animales; cada uno de estos últimos grupos recibió la misma dosis de hormona. Para su identificación, cada rana se colocó en compartimiento sepa-

---

(\*) Follutein, Squibb (E. R. Squibb & Sons, New York).

rado y numerado. Se anotó la reacción y cambio de peso de cada animal separadamente en cada experimento desde la primera a la quinta vez que se usaron. También se anotó el tiempo de la inyección y la temperatura del agua en los compartimientos.

Cada animal, sin tener en cuenta su peso, recibió en un volumen de 1 cm<sup>3</sup> su dosis de gonadotrofina. Las ranas se inyectaron en el saco dorsal linfático y siempre en el mismo orden, esto es, aquellas que recibieron una dosis baja en el primer experimento, continuaron recibiendo las dosis más bajas en experimentos sucesivos. Después de la inyección, la orina se examinó a intervalos de una, dos, tres y cuatro horas.

### Resultados.

En los cuatro grupos empleados (E, F, G y H), las reacciones positivas obtenidas con las diferentes dosis de gonadotrofina coriónica se anotaron en forma de porcentajes. Con los datos anteriores se calculó el promedio de animales que reaccionaron en cada grupo y la variación en susceptibilidad de cada rana.

Según Trevan (7) y Gaddum (2), si la eliminación de espermatozoides como respuesta a la inyección de gonadotrofina coriónica, está distribuida normalmente, entonces debe obtenerse una línea recta cuando los valores dosis-reacción se colocan en papel semilogarítmico.

Las ordenadas representan unidades de probabilidad "probits", correspondientes al porcentaje de reacciones positivas. Las unidades de probabilidad para todas las reacciones posibles las da Bliss (1) en la tabla 1, página 138. Las abscisas representan las dosis en unidades internacionales correspondientes a los números. Como un ejemplo, los resultados obtenidos con el grupo E, después de la primera inyección y en la segunda hora de observación, están indicados en la figura 1.

Según la gráfica anterior, 5, 3 unidades internacionales de gonadotrofina coriónica es la cantidad que se requiere para producir un 50 por 100 de reacción *en el término medio* de las ranas que forman este grupo (DR50) y corresponde a un "probit" 5. Este valor (503) es el más importante de toda la línea porque representa el promedio de la reacción en un grupo de animales.

La uniformidad con que este grupo de ranas reaccionó a la acción de gonadotrofina está indicada por la *inclinación* de la línea obtenida con los valores dosis-reacción. La inclinación se expresa como la tangente del ángulo formado entre la línea trazada y la horizontal. La inclinación se designa con el nombre de valor "b", que es el inverso



T A B L A 1

Resultados obtenidos con la inyección Gonadotropina Coriónica en la rana macho *Rana pipiens*.

Fecha 1949	Grupo	Días de intervalo	Promedio del peso en gr.	DR50 - Unidades Internacionales				b = Tan calculada gráficamente con los datos dosis - reacción											
				1 hr.		2 hr.		3 hr.		4 hr.		1 hr.		2 hr.		3 hr.		4 hr.	
Febrero 21	E		20,7	5,4	5,3	7,0	—	10,3	7,1	4,3	—								
Marzo 7	E	14	20,0	13,8	8,3	10,5	15,7	2,3	6,4	4,6	7,0								
Marzo 14	E	7	15,8	13,8	11,0	14,5	22,3	5,0	4,4	16,9	8,0								
Marzo 28	E	14	13,8	14,5	10,7	12,2	15,7	5,4	8,4	8,3	13,3								
Abril 11	F	14	12,0	14,3	9,5	11,5	15,5	6,4	4,8	5,7	6,4								
Febrero 24	F		20,2	12,5	10,5	10,0	9,8	2,6	2,5	2,6	6,8								
Marzo 3	F	8	19,3	15,5	9,5	13,0	17,2	2,3	6,8	4,3	3,8								
Marzo 10	F	7	15,7	11,2	10,8	11,3	16,7	4,2	5,1	6,6	8,1								
Marzo 30	F	20	14,1	14,5	8,6	11,9	24,0	5,3	2,8	4,4	5,4								
Abril 13	F	14	12,4	16,0	10,4	17,2	20,3	3,4	7,4	2,6	7,7								
Marzo 17	G		19,3	12,5	10,5	14,2	13,8	4,6	5,3	4,0	5,1								
Marzo 24	G	7	17,8	13,2	10,0	16,0	18,2	4,4	4,5	8,1	8,9								
Abril 2	G	9	16,3	18,5	12,0	12,7	17,5	7,3	8,1	8,2	12,5								
Abril 9	G	7	15,3	14,0	7,9	12,2	21,5	3,8	2,8	5,7	4,0								
Abril 16	G	7	14,0	16,5	9,1	12,0	18,2	4,3	3,4	1,9	4,0								
Marzo 21	H		18,3	13,6	11,0	18,5	20,5	7,7	6,5	3,1	2,7								
Marzo 28	H	7	16,9	16,6	10,5	14,5	22,5	2,9	5,5	5,7	4,0								
Abril 4	H	7	16,2	13,5	9,5	11,8	15,0	5,9	7,4	5,8	10,5								
Abril 11	H	7	15,0	14,5	7,6	10,5	19,6	6,2	3,8	2,7	3,9								
Abril 18	H	7	14,0	16,5	9,1	12,0	20,0	3,5	5,1	3,5	4,3								

La segunda hora tiene el resultado más bajo, lo que indica que dos horas después de la inyección las reacciones son más uniformes. La dosis promedial de gonadotrofina en la segunda hora de observación es 9.55 unidades internacionales; éste también es el promedio más bajo de DR50 durante las cuatro horas de observación, lo que indica que dos horas después de la inyección de gonadotrofina es el período de observación más aceptable.

*Uniformidad de los animales:* Como se indicó anteriormente, la uniformidad de un grupo de ranas en cuanto a su reacción con gonadotrofina coriónica está expresada por el valor "b". Con los datos de "b", tabla 1, se calculó la inclinación promedial para todos los experimentos, para cada vez que se usaron los animales y para cada hora de observación. La relación entre la mayor y la menor inclinación durante las cuatro horas de observación se indica enseguida:

	Promedio de las inclinaciones "b"	Relación entre mayor/menor inclinación
Primera hora	4.89	$10.3/2.2 = 4.48$
Segunda hora	5.40	$8.4/2.2 = 3.82$
Tercera hora	5.45	$16.9/1.9 = 8.89$
Cuarta hora	6.56	$13.3/2.7 = 4.93$

Los promedios de las inclinaciones son muy semejantes y todos se encuentran dentro de los límites apropiados para ensayos. La relación entre la mayor y la menor inclinación es más bajo a las dos horas de observación, lo cual confirma que dos horas es el período de observación más indicado.

El promedio de la inclinación "b" para cada uno de los cinco experimentos hechos en los cuatro grupos (E, F, G, y H) para las cuatro horas de observación es el siguiente:

Número Exper.	Horas después de la inyección				Promedio
	1	2	3	4	
Primero.....	6.30	5.35	3.50	4.87	5.00
Segundo.....	2.97	5.80	5.67	5.92	5.09
Tercero.....	5.60	6.25	9.37	9.77	7.75
Cuarto.....	5.17	4.45	5.27	6.65	5.39
Quinto.....	4.40	5.17	3.42	5.60	4.65
Promedio.....	4.89	5.40	5.45	6.56	

El tercer experimento tiene el promedio más alto (7.75), o en otras palabras, hay mayor uniformidad en los animales después de que estos se han usado dos veces. El promedio más bajo (4.65) en el quinto experimento indica que después de usar cuatro veces las mismas ranas éstas empiezan a variar en su reacción con gonadotrofina. En cuanto a las horas de observación, el promedio para las tres primeras es muy semejante. En la cuarta hora (6.56) las ranas muestran un poco de mayor uniformidad en la reacción.

*Uso repetido de los animales:* Los cuatro grupos de ranas se emplearon cinco veces a intervalos indicados en la Tabla I. Se comprobó que se puede establecer un método de ensayo en el cual los mismos animales se pueden usar por lo menos cuatro veces. Se hizo el ensayo de emplear las mismas ranas después de que éstas habían sido inyectadas por la quinta vez y las reacciones fueron muy heterogéneas. También se comprobó que las ranas usadas cinco veces o más, aumentan su resistencia a la acción de gonadotrofina y por consiguiente ya no son aceptables para estos ensayos.

*Influencia de la estación:* A medida que se acerca el tiempo del celo (primera parte de abril), se puede esperar que el lóbulo anterior de la hipófisis aumente su actividad; esto se ve claramente observando el DR50 de todos los experimentos en las diferentes fechas en que se realizaron éstos. Los promedios para DR50 y "b" en la segunda hora de observación se clasificaron según las fechas:

	DR50	-b-
Febrero 21 - Marzo 7 . . . . .	9.4	5.2
Marzo 7 - Marzo 24 . . . . .	10.7	5.2
Marzo 25 - Abril 8 . . . . .	9.9	6.0
Abril 9 - Abril 18 . . . . .	4.1	4.9

De febrero a abril 8, la dosis necesaria para producir el 50 por 100 de reacción es aproximadamente la misma, pero del 9 al 18 de abril el promedio baja considerablemente (4.1). La sensibilidad es aproximadamente constante según lo indican los promedios de las inclinaciones "b".

*Peso de los animales:* En la columna 4, Tabla 1 se encuentra el promedio del peso de las ranas, el cual disminuye en cada experimento. Durante los ensayos, los animales se guardaron siempre en las mismas condiciones de temperatura, medio, etc. No se puede decir definitivamente que la pérdida de peso se debe a la acción de la hormona, pero se observó que animales mantenidos en las mismas

condiciones que aquellos de los grupos experimentales, no perdieron peso en la misma proporción. A medida que el peso disminuye se necesita mayor cantidad de gonadotrofina para producir las mismas reacciones. Aunque esto no se observa en todos los casos, sin embargo parece que los animales más pequeños, especialmente aquellos que se han usado cinco veces, necesitan mayor cantidad de gonadotrofina para estimular la secreción de espermatozoides que animales de mayor tamaño cuando se usan por la primera vez.

*Intervalos entre experimentos:* El intervalo más pequeño fue de 7 días. El DR50 y "b", Tabla 1, en los grupos G y H no varía considerablemente, o sea, que los animales se pueden usar hasta cuatro veces con un intervalo de siete días entre cada experimento.

Si el intervalo de tiempo se aumenta a 49 días entre el primero y quinto experimentos, aparentemente los animales se vuelven más resistentes a la acción de la hormona. Este hecho puede estar íntimamente relacionado con el cambio en peso.

### *Conclusiones.*

1) La acción estimulante de la gonadotrofina coriónica sobre la secreción de espermatozoides en la rana macho *Rana pipiens* es una reacción adecuada para la determinación de la actividad de las preparaciones de gonadotrofina coriónica.

2) El mejor período de observación es dos horas después de la inyección de la hormona.

3) Los animales pueden emplearse por lo menos cuatro veces con intervalos de siete días. En este trabajo las ranas se usaron cinco veces.

4) El promedio de la dosis de gonadotrofina coriónica (DR50) para el período de observación de dos horas es 9.6 Unidades Internacionales por rana.

5) La inclinación de la curva de frecuencia integral es igual a 5.40 para el período de dos horas de observación. Este valor varía entre 4.45 y 6.25.

6) El peso puede influir en la dosis necesaria para producir reacción.

7) Se describe el procedimiento seguido en esta investigación.

### *Resumen.*

En esta investigación se concluyó que la secreción de espermatozoides en la rana macho *Rana pipiens* con la inyección de gona-

dotrofina coriónica es una reacción satisfactoria como procedimiento de ensayo biológico para la determinación de la actividad de las preparaciones de gonadotrofina coriónica. El procedimiento consistió en inyectar soluciones de la hormona en el saco dorsal linfático de la rana macho y dos horas más tarde observar en el microscopio la presencia de espermatozoides en la orina.

Se construyeron curvas de frecuencia integral para dosis/reacción para las reacciones de cada una de las cuatro horas de observación después de la inyección.

Se encontró que dos horas después de la inyección es el período de observación más adecuado.

El promedio de la dosis de gonadotrofina requerida es 9.6 Unidades Internacionales por rana.

#### SUMMARY

In this investigation it was concluded that secretion of spermatozoa by the male frog *Rana pipiens* on injection of chorionic gonadotrophin is a suitable reaction for a biological assay procedure for the determination of potency of chorionic gonadotrophin preparations. The procedure consisted of injection of solutions of the hormone into the dorsal lymph sac of the male frog, then after two hours the urine is observed microscopically for spermatozoa.

Integrated frequency curves for dose/response were constructed for reactions at hourly observation periods for four hours after the time of injection and for frogs which had been used up to five times.

The most suitable for observing the secretion of spermatozoa was found to be two hours after injection. Frogs can be used four times with at least a seven day interval between use.

The average dose of gonadotrophin required is 9, 6 International Units per frog.

#### Bibliografía

1. Bliss C. I.: Ann, Appl. Biol., 1935, 22, 134. — 2. Gaddum J. H.: Med Res. Council Spec. Rep., 1933. Series Nº 183. — 3. Galli Mainini C. La Semana Médica, 1947, 54, 337. — 4. Houssay B. A.: Rev. Soc. Arg.: Biol., 1947, 23, 114. — 5. Job B. K.: Tesis de grado. Universidad de Maryland, Maryland, U. S. A., 1949. — 6. Rugh R.: J. Exp. Zool., 1939, 80 81. — 7. Trevan J. W.: Proc. Roy. Soc., Ser. B., 1927, 101, 483. — 8. Wilterberger P. B., Miller D. F.: Science, 1948, 107, 198.