

Standardización de la Unidad Sapo en el Dosaje de Gonadotrofinas Coriónicas

CARLOS ROE GÓMEZ

INTRODUCCION

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 batracio 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 spinolosus limensis como animal tipo, siguiendo exactamente la técnica de Galli Mainini y analizando matemáticamente 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 folículo 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 hormone) 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 Leydig 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 ratas), 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 Pluhmann (5), encontraron que la orina y la sangre de la mujer gestante contenía una 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 extractores 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 molahidatiforme y corioepiteliona (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 la 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 a 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, mantienen 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 folículos 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 37º al 43º 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 del 40º día de la fecundación, y la gestación dura de 330-350 días).

Según Catchpol 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 folículo estimulante o sea predomina el factor F.S.H., lo que la diferen-

cia 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 gonadotrofina 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 gonadotrofinas coriónicas no sólo se encuentran en la orina y sangre, sino también en la saliva, líquido céfalo-raquídeo, sudor, líquido amniótico y jugo gástrico (1).

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 y 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 para el dosaje de Gonadotrofinas, 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 sea 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 inyección, el punto de vista tomado 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 de 0.1 mg. de una preparación standard de gonadotrofina 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 (18), propone una reacción, para el diagnóstico precoz del embarazo, que se basa en la liberación de espermatazoides en los tubos seminíferos del sapo macho, de donde pasan a los conductos eferentes 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 hombres y mujeres en estado normal, así como la orina de la mujer menopáusica y de hombres de más de 60 años, no produce reacción positiva. Los mismos resultados negativos obtiene con una serie de hormonas sexuales y con enfermos de ciertas endocrinopatías.

Todo ésto, 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 menopáusica. 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 gonado-

trofinas 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 gonadotrofina coriónica humana (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 Mancini (19) (20) dan resultados negativos con ..	30 U.I.
Houssay (21) da resultados negativos con	10 U.I.
Pinto y Suer (22) dan resultados negativos con	10 U.I.
Galli Mainini (17) de resultados positivos con	40 U.I.
Haskins y Sherman (23) dan result. posit. en el 75% con ..	35 U.I.
Haskins y Sherman dan resultados positivos 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:

- Al bajo número de animales empleados por algunos autores.
- Los distintos orígenes de las hormonas utilizadas.
- Las diferentes condiciones de ensayo, especialmente la técnica de inyección, temperatura del ambiente y condiciones de luz.
- 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.B.) 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).

MATERIAL Y METODOS

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 fluctuaba 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 Prolan, 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
Gonadotrofina Coriónica de origen equino	}	Anterón
		A.P.L.
		Gonadogen
		Pregnil
		Prolan

Desgraciadamente, no nos ha sido posible obtener en Lima, Folutéina, 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 a 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 Cortínicas 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

Peso del sapo (grm.)	Unidades inoculadas (U.I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
105	10	N	N	N
115	10	2	N	N
110	10	N	N	N
118	10	N	N	N
125	10	N	N	N
125	10	N	N	N
115	10	N	N	N
130	10	N	N	N
105	10	N	N	N
100	10	N	N	N

APOIDINA

100	20	N	N	N
105	20	N	N	N
118	20	N	N	N
112	20	N	N	N
120	20	N	N	N
113	20	N	N	N
110	20	N	N	N
130	20	N	N	N
128	20	N	N	N
100	20	N	N	N

APOIDINA

<i>Peso del sapo (grm.)</i>	<i>Unidades inoculadas (U. l.)</i>	<i>Resultados</i>		
		<i>2 horas</i>	<i>6 horas</i>	<i>24 horas</i>
115	30	N	N	N
95	30	N	N	N
100	30	N	N	N
105	30	3	2	N
100	30	N	N	N
112	30	N	N	N
110	30	2	N	N
113	30	N	N	N
110	30	N	N	N
98	30	N	N	N

APOIDINA

100	40	3	2	1
95	40	N	N	N
98	40	4	3	1
95	40	3	1	N
110	40	4	2	1
105	40	N	N	N
100	40	N	N	N
98	40	4	3	1
98	40	2	N	N
100	40	N	N	N

APOIDINA

Peso del sapo (<i>grm.</i>)	Unidades inoculadas (<i>U. l.</i>)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
105	45	4	2	N
100	45	3	2	N
95	45	4	1	N
95	45	4	1	N
95	45	4	1	N
100	45	3	1	N
95	45	2	1	N
100	45	4	2	N
105	45	1	N	N
95	45	4	2	1

APOIDINA

CUADRO RESUMEN

Unidades inocula- das (<i>U. l.</i>)	Nº de anima- les	Resultados				
		Positivos			Negativo	% Positivo
		2 hor.	6 hor.	24 hor.		
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

Peso del sapo (grm.)	Unidades inoculadas (U. I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
140	10	N	N	N
130	10	N	N	N
135	10	2	N	N
125	10	N	N	N
125	10	1	N	N
130	10	N	N	N
110	10	N	N	N
118	10	N	N	N
120	10	N	N	N
115	10	N	N	N

PRANTURON

105	20	N	N	N
110	20	N	N	N
100	20	2	N	N
95	20	N	N	N
105	20	N	N	N
105	20	1	N	N
100	20	N	N	N
118	20	N	N	N
112	20	N	N	N
100	20	N	N	N

PRANTURON

<i>Peso del sapo (grm.)</i>	<i>Unidades inoculadas (U. l.)</i>	<i>Resultados</i>		
		<i>2 horas</i>	<i>6 horas</i>	<i>24 horas</i>
110	30	N	N	N
100	30	N	N	N
105	30	2	N	N
95	30	N	N	N
95	30	3	1	N
98	30	N	N	N
95	30	2	N	N
100	30	N	N	N
105	30	N	N	N
110	30	N	N	N

PRANTURON

100	40	3	1	N
95	40	4	2	N
105	40	4	3	1
110	40	3	1	N
95	40	3	2	N
95	40	N	N	N
98	40	4	4	2
110	40	4	3	1
105	40	3	2	N
100	40	4	3	1

PRANTURON

Peso del sapo (grm.)	Unidades inoculadas (U. I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
95	45	4	2	1
98	45	3	1	1
100	45	4	2	1
105	45	4	1	N
95	45	3	N	N
98	45	3	N	N
100	45	4	1	N
110	45	3	1	N
98	45	3	1	N
100	45	2	1	N

PRANTURON

CUADRO RESUMEN

Unidades inocula- das (U. I.)	Nº de anima- les	Resultados				% Positivo
		Positivos			Negativo	
		2 hor.	6 hor.	24 hor.		
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

Peso del sapo (grm.)	Unidades inoculadas (U. I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
140	50	N	N	N
120	50	N	N	N
110	50	N	N	N
115	50	N	N	N
100	50	N	N	N
95	50	N	N	N
105	50	N	N	N
110	50	N	N	N
100	50	N	N	N
98	50	N	N	N

ANTERON

100	60	N	N	N
98	60	N	N	N
105	60	3	N	N
110	60	N	N	N
115	60	N	N	N
100	60	2	N	N
95	60	N	N	N
95	60	N	N	N
105	60	N	N	N
115	60	N	N	N

ANTERON

<i>Peso del sapo (grm.)</i>	<i>Unidades inoculadas (U. l.)</i>	<i>Resultados</i>		
		<i>2 horas</i>	<i>6 horas</i>	<i>24 horas</i>
105	70	3	1	N
110	70	N	N	N
100	70	N	N	N
95	70	N	N	N
95	70	4	2	N
100	70	N	N	N
105	70	N	1	N
95	70	N	N	N
110	70	2	N	N
100	70	N	1	N

ANTERON

95	80	N	N	N
98	80	3	1	1
105	80	3	1	N
95	80	4	2	1
100	80	2	N	N
100	80	N	N	N
105	80	N	N	N
98	80	4	1	N
98	80	2	N	N
100	80	N	N	N

ANTERON

Peso del sapo (<i>gram.</i>)	Unidades inoculadas (U. I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
95	85	4	2	1
98	85	3	1	1
95	85	3	1	1
100	85	N	N	N
95	85	4	N	N
105	85	4	2	N
110	85	2	N	N
105	85	1	N	N
100	85	4	1	N
98	85	3	N	N

ANTERON

CUADRO RESUMEN

Unidades inocula- das (U. I.)	Nº de anima- les	Resultados				% Positivo
		Positivos			Negativo	
		2 hor.	6 hor.	24 hor.		
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

Peso del sapo (grm.)	Unidades inoculadas (U.I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
95	70	N	N	N
130	70	N	N	N
120	70	N	N	N
110	70	N	N	N
125	70	N	N	N
130	70	N	N	N
130	70	N	N	N
110	70	N	N	N
120	70	N	N	N
100	70	N	N	N

PREGNIL

95	80	N	N	N
105	80	4	2	N
95	80	N	N	N
115	80	N	N	N
120	80	N	N	N
110	80	N	N	N
125	80	N	N	N
100	80	N	N	N
95	80	N	N	N
110	80	N	N	N

PREGNIL

Peso del sapo (grm.)	Unidades inoculadas (U. l.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
95	90	N	N	N
100	90	2	N	N
90	90	N	N	N
120	90	3	N	N
125	90	N	N	N
130	90	N	N	N
100	90	4	1	N
105	90	2	N	N
120	90	3	N	N
100	90	N	N	N

PREGNIL

120	95	3	N	N
100	95	4	2	N
95	95	2	1	N
100	95	3	2	1
100	95	N	N	N
100	95	4	1	N
95	95	2	1	N
100	95	3	1	N
105	95	1	N	N
100	95	3	1	1

PREGNIL

Peso del sapo (gm.)	Unidades inoculadas (U.I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
95	100	4	3	2
95	100	4	2	1
100	100	4	2	N
100	100	3	1	N
98	100	4	3	N
100	100	4	4	2
100	100	2	N	N
105	100	4	2	1
95	100	4	1	N
95	100	3	1	N

PREGNIL

CUADRO RESUMEN

Unidades inocula- das (U.I.)	Nº de anima- les	Resultados				
		Positivos			Negativo	% Positivo
		2 hor.	6 hor.	24 hor.		
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

A. P. L.

Peso del sapo (grm.)	Unidades inoculadas (U.I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
140	60	N	N	N
130	60	N	N	N
100	60	4	N	N
120	60	N	N	N
125	60	N	N	2
115	60	2	N	N
110	60	N	N	N
105	60	N	N	N
120	60	N	N	N
120	60	N	N	N

A. P. L.

110	70	2	N	N
105	70	N	N	N
98	70	N	N	N
105	70	N	N	N
100	70	N	N	N
105	70	N	N	N
115	70	2	N	N
110	70	N	4	2
120	70	N	N	N
100	70	N	N	N

A. P. L.

Peso del sapo (grm.)	Unidades inoculadas (U. I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
100	80	N	N	N
100	80	3	N	N
105	80	N	N	N
100	80	2	N	N
95	80	3	1	N
98	80	2	1	N
105	80	1	N	N
110	80	N	2	N
95	80	N	N	N
95	80	N	N	N

A. P. L.

95	90	4	2	N
102	90	2	1	N
105	90	3	3	1
112	90	N	N	N
118	90	4	2	N
125	90	3	2	N
100	90	2	1	N
100	90	1	N	N
104	90	4	1	N
118	90	N	N	N

A. P. L.

Peso del sapo (grm.)	Unidades inoculadas (U. l.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
95	100	4	3	2
95	100	4	2	1
100	100	4	1	N
100	100	1	N	N
98	100	4	4	2
98	100	4	3	N
95	100	3	1	2
95	100	4	3	N
95	100	2	1	N
98	100	4	2	1

A. P. L.

CUADRO RESUMEN

Unidades inocula- das (U. l.)	Nº de anima- les	Resultados				% Positivo
		2 hor.	6 hor.	24 hor.	Negativo	
60	10	2	0	1	7	30
70	10	2	1	1	7	30
80	10	5	3	0	4	60
90	10	8	7	1	2	80
100	10	10	9	5	0	100

GONADOGEN

Peso del sapo (<i>gram.</i>)	Unidades inoculadas (<i>U. l.</i>)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
115	50	2	N	N
110	50	N	N	N
100	50	N	N	N
95	50	N	N	N
98	50	3	1	N
140	50	N	3	N
130	50	N	N	N
110	50	1	N	N
100	50	N	N	N
100	50	4	N	N

GONADOGEN

95	60	2	N	N
100	60	N	N	N
105	60	N	1	1
110	60	N	N	N
115	60	1	N	N
118	60	N	N	N
120	60	N	N	N
112	60	3	N	N
100	60	N	N	N
95	60	N	N	N

GONADOGEN

<i>Peso del sapo (grm.)</i>	<i>Unidades inoculadas (U. l.)</i>	<i>Resultados</i>		
		<i>2 horas</i>	<i>6 horas</i>	<i>24 horas</i>
100	70	2	1	N
105	70	N	N	N
100	70	4	2	1
100	70	3	1	N
98	70	4	1	N
98	70	1	N	N
95	70	2	N	N
100	70	N	N	N
105	70	N	N	N
110	70	N	N	N

GONADOGEN

115	75	3	1	N
118	75	4	2	1
108	75	4	1	N
110	75	3	N	N
95	75	3	N	N
98	75	N	N	N
95	75	N	N	3
100	75	3	N	N
95	75	3	1	N
95	75	4	1	N

GONADOGEN

Peso del sapo (gram.)	Unidades inoculadas (U.I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
95	80	4	2	N
98	80	4	1	N
98	80	4	2	1
100	80	N	N	N
105	80	3	1	N
95	80	4	1	N
100	80	3	2	N
100	80	3	1	N
95	80	3	2	N
110	80	2	N	N

GONADOGEN

CUADRO RESUMEN

Unidades inocula- das (U.I.)	Nº de anima- les	Resultados			Negativo	% Positivo
		Positivos				
		2 hor.	6 hor.	24 hor.		
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	9	10

PROLAN

Peso del sapo (<i>gram.</i>)	Unidades inoculadas (<i>U. I.</i>)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
114	60	N	N	N
110	60	N	N	N
110	60	2	N	N
115	60	N	N	N
100	60	N	N	N
110	60	N	N	N
120	60	N	N	N
115	60	N	3	N
100	60	N	N	N
105	60	N	N	N

PROLAN

100	70	N	N	N
105	70	N	N	N
105	70	4	2	N
110	70	N	N	N
95	70	N	N	N
95	70	2	N	N
95	70	N	N	N
98	70	1	N	N
100	70	N	2	N
115	70	N	N	N

PROLAN

Peso del sapo (<i>gram.</i>)	Unidades inoculadas (<i>U. I.</i>)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
100	80	N	N	N
95	80	N	N	N
95	80	3	2	N
95	80	N	N	N
98	80	N	N	N
100	80	2	N	N
105	80	N	N	N
95	80	N	N	N
95	80	N	N	N
96	80	N	N	N

PROLAN

95	90	4	3	1
98	90	3	1	N
95	90	4	2	N
100	90	N	N	N
105	90	N	N	N
115	90	N	N	N
95	90	3	1	N
98	90	N	N	N
100	90	3	1	N
95	90	2	2	N

PROLAN

Peso del sapo (grm.)	Unidades inoculadas (U.I.)	Resultados		
		2 horas	6 horas	24 horas
105	100	4	2	N
115	100	3	1	N
118	100	4	2	N
95	100	2	N	N
98	100	4	3	1
95	100	3	2	N
98	100	3	1	N
98	100	4	3	1
95	100	N	N	N
97	100	4	2	N

PROLAN

CUADRO RESUMEN

Unidades inocula- das (U.I.)	Nº de anima- les	Resultados				
		Positivos			Negativo	% Positivo
		2 hor.	6 hor.	24 hor.		
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

ANALISIS 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. Caddum, 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 o 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 del 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%,

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	20	30	40	45
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 positivos	2	4	7	16	26
Total negativos	24	16	8	1	0
Porcentaje de positivos ..	7.6	20	46	94	100

ANTERON

Unidades	50	60	70	80	85
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	10 u.i.	20 u.i.	30 u.i.	40 u.i.	45 u.i.
Unidades	60	70	80	90	100
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	80	90	95	100
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

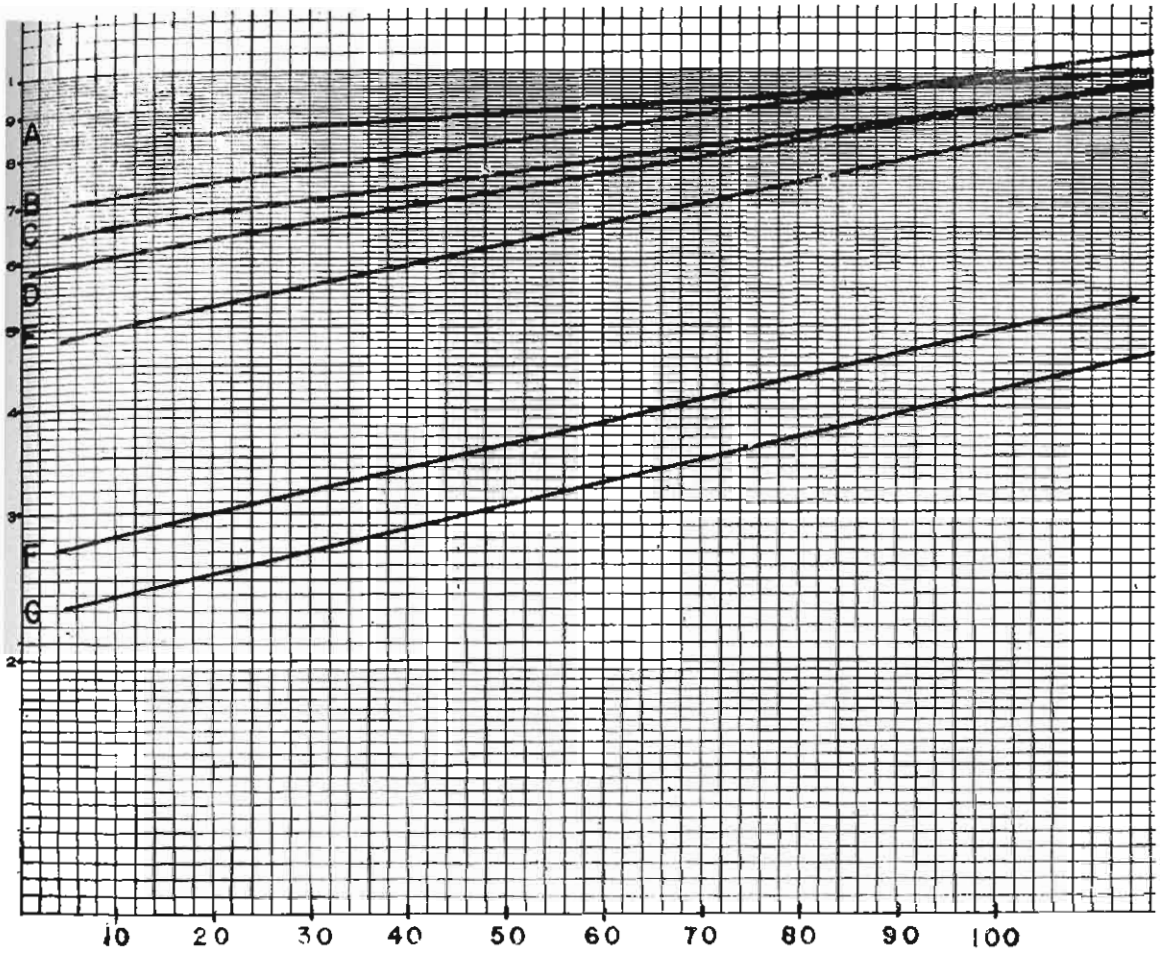
GONADOGEN

Unidades	50	60	70	75	80
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	12	6	2	1
Porcentaje de positivos ..	22.7	42.8	71.4	92.3	97

PROLAN

<i>Unidades</i>	<i>10 u.i.</i>	<i>20 u.i.</i>	<i>30 u.i.</i>	<i>40 u.i.</i>	<i>45 u.i.</i>
Unidades	60	70	80	90	100
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

GRAFICA 1



% REACCIONES POSITIVAS

- A — Pregnil 90 U.I.
- B — Prolán 82 U.I.
- C — A.P.L. 75 U.I.
- D — Anterón 73 U.I.
- E — Gonadogen 62 U.I.
- F — Apoidina 36 U.I.
- G — Pranturón 31 U.I.

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.

DISCUSION

El criterio para determinar el valor de una respuesta biológica, según los conceptos modernos del Biodosaje, 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 la 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 cuantil. 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 y Mainini	40 U.I.
San Martín y Zorrilla	10 U.I.

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

- a) Bajo número de animales empleados en las determinaciones.
- b) Distintos orígenes de las hormonas empleadas.
- c) Diferentes condiciones de ensayo.

- d) Diferente especie del animal usado (sapo).
- e) Falta de la definición del valor umbral.

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

- a) 420 animales.
- b) 7 productos hormonales de 2 orígenes diferentes.
- c) La técnica de Galli Mainini.
- d) El Sapo de Lima y alrededores (*Bufo Spinolosus Limensis*).
- e) 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.
		Prolan	— 86 U.I.

Vemos, a simple vista, que los resultados se pueden ordenar en dos grupos: uno, de las hormonas Gonadotróficas 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 sólo 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 vaciación de las células de Sertoli 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 Prolan 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 Prolan y los resultados encajan en el grupo de la 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 gráfico-matemática de los resultados obtenidos puede apreciarse claramente en el cuadro 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; estos 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 y 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).

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ALEEN, DANFORTH Y DOISY: "Sex and Internal Secretions".
- 2.—SMITH, P. E.: J. A. M. A. 88: 158, 1927.
- 3.—FEVOLD, H. L.; HISAW, F. L. and LEONARD, S. L.: Am. Jour. Physiol. 97: 291, 1931.
- 4.—WOLF W.: "Endroquinología en la práctica moderna".
- 5.—FLUHMAN, C. F.: J. A. M. A. 93: 672-1136, 1929.
- 6.—PINCUS, G. and THIMAN, K.: "The Hormones". Vol. II.
- 7.—PINCUS, G. and THIMAN, K.: "The Hormones". Vol. I.
- 8.—ZORRILLA, TOBIÁS OLIVAS: "Excreción de Gonadotropinas Coriónicas en el Embarazo normal, Mola Hidatiforme y Corioepitelioma". Tesis de Bachiller. 1950.
- 9.—WISLOCKI, G. B. and BENNET, H. S.: Am. Jour. Anat. 73: 335, 1943.
- 10.—EVANS, H. M. and SIMPSON, M. E.: Am. Jour. Physiol. 89: 371, 1929.
11. FLUHMAN, C. F.: Endocrinology, 15: 177, 1931.
- 12.—COLE, H. H. and HART, G. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 32: 370, 1934.
- 13.—CATCHPOLE, H. R. and LYONS, W. R.: Am. Jour. Anat. 55: 167, 1934.
- 14.—PINCUS, G. and THIMAN, K.: "The Hormones". Vol. II.
- 15.—LEVIN, L.: Endocrinology, 28: 378, 1941.
- 16.—League of Nations. Quart. Bull. Health-Organization League Nations. 8: 884, 1939.
- 17.—GALLI MAININI, CARLOS: La Semana Médica, 12: 337, 38: 447, 1947.
- 18.—DE ROBERTIS, E.; BURGOS, M. H. y BREYER, E.: Rev. Soc. Arg. Biol. 21: 369, 1945.
- 19.—BURGOS, M. H. y MANCINI, R. E.: Rev. Soc. Arg. Biol. XXIV: 328-336, 1948.
20. BURGOS, M. H. y MANCINI, R. E.: Rev. Soc. Arg. Biol. XXXIII: 154-164, 1947.
- 21.—Citado por Schewitzer y Bas J.: La Semana Médica. 45: 980, 1948.
- 22.—PINTO, R. M. y SUER, H. J.: La Prensa Médica Argentina, 4: 165, 1948.
- 23.—HASKINSKI, A. L. and SHERMAN, A. I.: Endocrinology. 44: 542, 1949.
- 24.—SCHEWITZER, E. y BAS, J.: La Semana Médica, 40: 703, 1948.
- 25.—SAN MARTÍN MAURICIO y ZORRILLA, T.: Rev. de la Facultad de Medicina Veterinaria. IV: 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. and MUENCH, H.: The Am. Jour. of Hygi. 27: 3, 1938.