

OVULACION DEL SAPO BUFO ARENARUM HENSEL

II. — Fenómenos ováricos

B. A. HOUSSAY

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

El ovario del *Bufo arenarum* Hensel ha sido bien descrito por la Dra. de Allende (1). Al abrir una hembra madura sexualmente, el abdomen aparece lleno por la masa negra de los ovarios, detrás del cual o entre cuyos repliegues se observan el estómago y el intestino y por detrás de ellos los riñones.

El ovario de cada lado es una cinta larga y replegada cuyo borde externo extendido mide 25 a 35 cm, mientras que su borde interno, más corto, se inserta en un mesoovario transparente de 2,5 a 2,7 cm de ancho. Cada ovario está formado por 23 a 32 sacos ováricos. Cada saco o lobulillo es una bolsa achatada, en general triangular o piriforme, con base ancha hacia el borde libre del ovario y punta redondeada hacia el mesoovario. Cada saco constituye una unidad anatómica y funcional y en su pared están colocados los óvulos. La pared del saco es delgada, salvo los óvulos, y la cavidad es virtual. Inyectando líquido se distiende fácilmente, pues es elástico, viéndose la pared estirada y con los óvulos separados, siendo entre ellos la pared transparente. En cada saco llegan a caber entre 2 y 7 cm³ de agua, pero en general estallan cuando se han inyectado 4 a 5 cm³.

Se ha estudiado detalladamente el aspecto macroscópico (1) y microscópico (1, 2) del ovario. La Dra. Allende clasifica los óvulos en grandes, medianos y chicos, habiendo contado 23.000

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

en un caso; nosotros hallamos entre 25.000 y 45.000 óvulos maduros expulsados en cada ovulación y ovoposición completa. La irrigación es importante y ha sido también descripta (^{1, 2}). Durante la ovulación salen del ovario los huevos maduros, grandes y bipigmentados, quedando el ovario reducido a minúsculos flecos amarillentos, que son sacos con óvulos pequeños o medianos y algunos melanocitos esféricos o poliédricos o ramificados.

El ovario aumenta paulatinamente de peso, al crecer los óvulos, desde marzo hasta julio o agosto. Al producirse la ovulación y postura ovular, a fin de agosto o principio de septiembre, se produce una enorme caída del peso. Luego éste asciende desde noviembre y en especial desde diciembre hasta marzo, para iniciarse entonces la maduración final que ocurre en el invierno (⁴). Esta descripción corresponde a la mayoría de las hembras maduras y que ovulan, pero algunas pueden no ovular. La composición química de los ovarios ha sido estudiada por Mazzocco (⁴), mes por mes durante todo el año, en lo que respecta a agua, proteínas, glucógeno, ácidos grasos y azufre. El enorme crecimiento del ovario aumenta el volumen y el peso corporal de la hembra. El cuerpo adiposo es una reserva nutritiva, que crece en el verano y disminuye progresivamente de abril a septiembre, época del ayuno invernal (⁵).

Los dos ovarios de las hembras de 200 a 250 g, llenos de óvulos maduros pesan 40 a 62 g (con más frecuencia alrededor de 52 g). Producida la ovulación, los óvulos llegan al útero dentro de hilos translúcidos hialinos segregados por el oviducto; esa masa pesa 45 a 65 g. Expulsados al exterior, estos cordones con óvulos absorben agua y llegan a pesar 190 a 230 g, o sea más que la hembra evacuada. Absorben 4 a 4,5 veces su peso en agua, en relación con su peso en el útero.

Cronología de la ovulación (vía y temperatura). — Implantando o inyectando *pars distalis* de hipófisis de sapo por vía subcutánea la cronología de la ovulación es la descripta por Allende (¹). A las 8 - 10 horas los ovarios están turgentes, con muy ligera acumulación de líquido en cada bolsa. La dilatación de los vasos es un fenómeno muy constante y típico. Los óvulos hacen más relieve al exterior del saco. Se hallan pocos óvulos libres a las 8 - 10 horas y en cantidad considerable a las 12 horas.

Los úteros están a veces llenos a las 12 horas y con mayor frecuencia a las 14 - 18 horas. La expulsión de los óvulos (ovopostura u ovoposición) se produce entre las 15 y 48 horas, más a menudo al día siguiente de la inyección.

Por vía endovenosa los fenómenos se aceleran (tabla 1). La temperatura es importante: no hay ovulación a 10° ó menos (0°, 4°, 8°) y es inconstante a 15°; la acción máxima se observa entre 22° y 30° y no mejora a 35°. A 39° se observa mortalidad en pocas horas y no hay ovulación. La ovulación más temprana observada ha sido a las 5 horas de la inyección venosa, pero en general se observa entre las 6 y 8 horas.

TABLA 1

Ovulación, transporte de los óvulos y ovopostura de hembras de "Bufo arenarum" Hensel, inyectadas en la vena abdominal con dos lóbulos (pars distalis) de hipófisis de sapo

	Ovulos libres	Ovulos en el oviducto	Ovulos en el útero	Ovulación total	Expulsión al exterior
<i>al cabo de horas</i>					
A 30°C	5-6	6-8	8-10	8-10	10-12
A 22°C	6-7	7-8	9-10	8-10	10-12
A 10°C	no	no	no	no	no en 4 días
<i>Inyectadas por vía subcutánea</i>					
A 23°C	8-10	9-12	12-16	16-22	15-48

Se inyectó 5 mg de polvo de *pars distalis* de sapo, por vía endovenosa, a hembras mantenidas a 8° y no ovularon en 4 días. A las 48 horas se llevaron algunas a 23° y ovularon casi todas.

Por vía endovenosa se produce ya secreción del oviducto y paso de cordones hialinos al útero antes que comience la ovulación. Luego llegan cordones con óvulos en su interior.

Estado del ovario. — Además de una temperatura y dosis adecuada de *pars distalis* de hipófisis de sapo, para que se pro-

duzca la ovulación es necesario que el ovario de sapo esté bien desarrollado y contenga óvulos grandes bipigmentados, como describió Allende (1). Entre octubre y enero son frecuentes los fracasos, si se inyectan hembras que han ovulado completamente en septiembre y cuyos ovarios sólo contienen óvulos medianos o pequeños. En cambio, las hembras ovulan normalmente si tienen óvulos grandes, porque no estuvieron abrazadas y no ovularon en la época sexual reciente. Los porcentajes positivos aumentan desde marzo y sobre todo desde mayo a agosto-septiembre.

El ayuno prolongado, en verano, disminuye algo las respuestas positivas obtenidas con dosis bajas de hipófisis. Señalamos en un trabajo anterior (3) que las hembras hipofisoprivas desde un mes o más tiempo sólo ovulan con dosis altas y no todas.

Acción local. — Inyectando 0,2 a 0,3 mg de *pars distalis* seca de hipófisis de sapo en 0,3 a 0,4 cm³ de solución cloruro sódica (0,65 %) en una bolsita ovárica, ovuló esa bolsa y no el resto del ovario (fig. 1). La dosis de 0,5 mg (a veces 0,4 mg) hacía evacuar a todos los ovarios, dada por vía subcutánea o intraovárica. No hubo ovulación en los testigos colocando 0,3 a 0,1 cm³ de solución de cloruro sódico en una bolsita ovárica. No hubo ovulación si se interrumpió completamente la circulación de una bolsita ovárica antes de inyectar hipófisis en su cavidad.

Obtuvimos ovulación de un saco en algunos casos (la mitad) inyectando en su interior gonadotrofina coriónica en dosis de 1000 unidades.

No produjeron ovulación de un saco ovárico, cuando se inyectaron en su interior la gonadotrofina de suero de yegua preñada (1000 unidades), ni el benzoato de estradiol (10 mg) ni el propionato de testosterona (5 mg), ni dos hipófisis de rata o 50 mg de lóbulo anterior de hipófisis bovina.

Necesidad de la irrigación. — Interrumpiendo la irrigación de una parte del ovario (3 a 5 lóbulos o medio ovario) e inyectando luego 3 lóbulos (*pars distalis*) de hipófisis de sapo, se observó la ovulación total de todo el ovario menos la parte isquemada. Practicando la isquemia de los lóbulos o parte del ovario al cabo de algún tiempo (5 minutos, 1, 3 horas) de inyectar 5 mg de polvo de hipófisis de sapo en las venas, ovuló todo el ovario menos la parte ligada.

Se lavaron sapos con solución de Ringer inyectada por el cabo anterior de la vena abdominal cortada, hasta que el líquido que saliera por el cabo posterior de la vena no contuviera sangre visible. Entonces se inyectaron tres lóbulos hipofisarios de sapo y al día siguiente ovularon las hembras. Pero se comprobó que los vasos contenían sangre y el lavado era incompleto.

No se obtuvo la ovulación perfundiendo los órganos abdominales y el ovario con Ringer que contenía lóbulos hipofisarios (1 mg de polvo seco, en 10 cm³) durante 24 horas. O bien el líquido era inadecuado para mantener la vitalidad o arrastró algo indispensable o bien es necesaria la presencia de sangre.

Ovario libre en el abdomen. — La Dra. Allende ha observado turgescencia de lóbulos ováricos y la liberación de óvulos en escasa cantidad en los ovarios dejados libres en el abdomen de sapos hembras o machos enteros o castrados o hipofisoprivos o castrados hipofisoprivos, a los cuales se inyectó *pars distalis* de hipófisis. No hubo esos cambios en los ovarios libres en el abdomen de sapos que no recibieron hipófisis.

No hemos podido observar la ovulación en varios experimentos y también otros investigadores (^{6, 5}) obtuvieron resultados negativos. Se puso medio a un ovario en el peritoneo de machos y hembras (privadas de su ovario) y se inyectó un animal de cada sexo con 1 a 10 mg de *pars distalis* de hipófisis, dejándose un testigo sin inyectar de cada sexo. Cuando hay aspecto lechoso o saliencia de óvulos o liberación de algunos, se observa tanto en inyectados como en testigos en forma variable. Estos fenómenos de autólisis no son ovulaciones verdaderas.

Ovulación "in vitro". — Varios autores han observado la ovulación *in vitro* de fragmentos de ovario puestos en líquido de Holtfreter al que se agregó *pars distalis* de hipófisis de sapo o con hormona foliculo estimulante de oveja (⁹). Otros afirman que la ovulación *in vitro* no existe y que lo que se observa es necrosis y degeneración del ovario con liberación y citólisis de los óvulos (^{8, c}).

El fenómeno fué investigado con bolsitas ováricas enteras o con fragmentos de ovario con unos 50 a 100 óvulos colgados en 30 cm³ de: a) líquido de Holtfreter; b) cloruro de sodio al 0,65 %; c) diluciones de ambos líquidos con agua. A esos líqui-

dos se agregaron cantidades de *pars distalis* de hipófisis de sapo, entre 10 mg y 0,005 mg para cada 10 cm³, sin que hubiera liberación de óvulos distinta que en los testigos, al cabo de 24 a 32 horas a 18° - 23°. Tampoco hubo ovulación con la inyección de 0,5 a 5 mg de *pars distalis* en 0,5 - 1 cm³ en una bolsita ovárica suspendida en líquido de Holtfreter

No se observó la ovulación *in vitro* poniendo los sacos o trozos de ovario en suero de sapo, puro o diluido ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{10}$) adicionado de *pars distalis* seca de hipófisis de sapo (0,1, 1, 3 mg por 10 cm³). Ni poniéndolos *in vitro* en suero de sapo, puro o al $\frac{1}{4}$, inyectado con 5 mg de *pars distalis* seca. Sin embargo, la inyección endovenosa de 5 cm³ de ese suero hizo ovular a hembras llenas de huevos maduros.

Inyectóse 10 mg de *pars distalis* seca de sapo a varias hembras. Sus ovarios extraídos a las 5 horas tenían óvulo salientes y aspecto muriforme, o sea que faltaba poco para la ovulación. Puestos en líquido de Ringer, al día siguiente se habían expulsado entre 50 y centenares de óvulos.

Contracción del ovario. — Aunque las contracciones espontáneas del ovario han sido observadas en muchos otros batracios no son visibles en el ovario de *Bufo arenarum* Hensel, observado *in situ* o aislado en líquido de Ringer u Holtfreter. Las bolsas ováricas colgadas a una palanca que amplificaba 15 veces, al ser excitadas con corrientes inducidas tetanizantes apenas si mostraron un desplazamiento de 1 a 2 mm, lento y mínimo. No reaccionaron al cloruro de bario (aun al 1:1.000) ni a la atropina (1:20.000). La acetilcolina (al 2 :1.000) apenas si produjo una ínfima contracción inconstante. La adrenalina Parke Davis (1:20.000) produjo una pequeñísima relajación (1 a 2 mm) que no se obtuvo con adrenalina pura sin preservativo. El extracto de lóbulo posterior de hipófisis (1 mg lóbulo posterior buey en 1 cm³) produjo contracción lentísima, mínima e inconstante.

Las bolsas ováricas son elásticas como se comprueba al hincharlas con agua o por su estiramiento y retracción cuando se les cuelga un peso y luego se saca. Pero su contractibilidad es prácticamente nula y todo se reduce a una ínfima reacción elástica lenta.

Enzimas proteolíticas. — No se pudieron demostrar agregando extractos de diversos productos ováricos a tubos con 5 cm³ de

gelatina al 10 %, ligeramente alcalina al tornasol, timolada al 2 ‰. Se agregaron: a) 0,5 a 1 cm³ de productos ováricos de óvulos libres en el peritoneo; b) 1 cm³ de líquido de lavado de ovarios y óvulos con 5 cm³ de solución salina; c) tres lóbulos ováricos recogidos a las 3 horas, 5 y 6 horas de inyectar tres lóbulos hipofisarios. Después de dejarlos tres horas a 30° y 38°, la gelatina se solidificó al ponerla en agua helada.

Si existe enzima proteolítica, una catepsina, habrá que usar métodos muy sensibles para hallarla y usar ovarios sin ovular como testigos.

Descripción de la ovulación. — Desde horas antes se observa dilatación de los vasos sanguíneos y una circulación muy activa en arteriolas y capilares. Se observa una saliencia de los óvulos, mientras que el peritoneo es brillante y muy transparente lo que lo hace parecer adelgazado.

A las 6-7 horas se observa un agujero en la pared externa del folículo, sobre la parte saliente del óvulo, en un área avascular, sin que se produzca hemorragia. El orificio es discoide y se ensancha paulatinamente hasta que al llegar al ecuador el óvulo sale, en general bruscamente. En algunos folículos el óvulo hace hernia saliente por el orificio y está deformado como si estuviera a presión en el folículo. Al saltar el óvulo queda un orificio como una copita retraída de borde festoneado que se achica bruscamente al principio y luego paulatinamente. Luego se ve como una hendidura del estroma ovárico entre los óvulos aún adherentes.

El estudio histológico del ovario y el folículo durante y después de la ovulación ha sido encomendado al Dr. De Robertis a quien proporcionamos el material de estudio.

Mecanismo de la ovulación. — Es difícil explicar la causa de la apertura del folículo o sea si se debe a una presión o a una proteolisis. El óvulo está sometido a una presión durante su expulsión como lo demuestra su deformación mientras va siendo eliminado del folículo. La expulsión del óvulo por presión intrafolicular puede compararse a un parto del ovulo en cada folículo.

Las hipótesis sobre el mecanismo de la ovulación han sido discutidas por Rugh (1) y De Robertis (2). El aumento de presión intrafolicular, no puede atribuirse a hemorragia ni a líquido intrafolicular, porque no se observan. Quedan como posibles: a) con-

tracción muscular lisa; b) hinchamiento del óvulo. La escasa contractilidad del ovario, no visible, excluye una acción muscular extraña al folículo. En cambio existe músculo liso en la pared folicular, por lo que la ovulación parece ser el parto de cada óvulo por la contracción del músculo liso de la pared de cada folículo ovárico. No se sabe si hay además imbibición del óvulo.

Rugh (7) ha observado una liberación de óvulos agregando al líquido de Holtfreter con 0,2 % de ácido clorhídrico y 0,2 % de pepsina. No la obtuvo con el ácido solo, la pepsina sola o la tripsina. Confirmamos esa observación (con ácido al 0,4 % y pepsina 0,3 %), pues a 38° había óvulos sueltos a los 10 minutos y eran numerosos a los 20 minutos. Pero el fenómeno es una digestión de diversas partes del ovario y su aspecto es diferente del de la ovulación, con la que el fenómeno sólo guarda una analogía superficial.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1) La inyección de *pars distalis* de hipófisis de sapo (por vía endovenosa, subcutánea, intramuscular o intracraneana) hace ovular al sapo hembra si sus óvulos están grandes.

2) El ovario es refractario si los óvulos son chicos, por ser infantil el sapo o por ser una hembra que ha ovulado muy poco antes. La sensibilidad a la gonadotrofina hipofisaria aumenta a medida que crecen los óvulos bipigmentados y llega a su máximo al fin del invierno (agosto a setiembre).

3) La ovulación más rápida se ha observado a las 5-6 horas de la inyección. Se estableció, con diferentes dosis y vías y temperatura, los siguientes fenómenos: ovulación, paso por oviducto, llegada al útero, paso a la cloaca y expulsión al exterior por el ano.

4) La inyección de una dosis subliminal hecha directamente en una bolsita ovárica hace ovular sólo a esa bolsita. No hay ovulación si se inyecta sólo solución salina sin *pars distalis* de hipófisis.

5) No hay ovulación de cualquiera parte del ovario cuyos vasos sanguíneos se han ligado, si se inyecta luego *pars distalis* por vía subcutánea o endovenosa o en una bolsita ovárica.

6) No hubo ovulación en ovarios perfundidos *in situ* durante 24 horas con Ringer conteniendo *pars distalis*.

7) No se obtuvo ovulación *in vitro* poniendo sacos ováricos en líquidos de Ringer u Holtfreter o suero de sapo que contenían *pars distalis*.

8) No se observaron contracciones visibles del ovario *in situ* o de fragmentos ováricos supervivientes.

9) En la ovulación se abre un orificio en un punto avascular de la parte del folículo que mira al abdomen. Se ensancha por presión del óvulo que se deforma un poco mientras va dilatando el orificio y va saliendo; al expulsarse queda una cavidad que se retrae. La expulsión se debe a la compresión del óvulo por el músculo liso de la pared folicular, no sabiéndose si se hincha el óvulo. La expulsión es activa y comparable al parto de cada óvulo

S U M M A R Y

Injection of *pars distalis* of the hypophysis (intravenous, subcutaneous, intramuscular or intracranial) causes ovulation in the toad *Bufo arenarum* Hensel. The sensitivity to hypophysial gonadotrophin increases with the size of the ovules and is maximal at the end of the Winter (August-September). If the ovules are too small no response is obtained. Ovulation may be observed even 5-6 hours after the injection. If the blood vessels of any section of the ovary are ligated no ovulation is observed in it.

A subliminal dose injected directly into an ovarian sac causes local ovulation.

No ovulation was observed in ovaries perfused "*in situ*" during 24 hours with Ringer plus *pars distalis* nor submerged *in vitro* in Ringer or Holtfreter solution or toads serum containing *pars distalis*.

No visible contractions of the ovaries were observed *in situ* or in ovarian fragments.

In ovulation an orifice opens in an avascular region of the follicle. This orifice widens due to the pressure of the ovule; expulsion is an active process and is due to the compression of the ovule by the plain muscle of the follicular wall.

B I B L I O G R A F I A

1. Allende, I. L. de: Aparato sexual femenino del *Bufo arenarum*. Bs. Aires, S. de Amorrortu, 1938. — 2. De Robertis E.: En publicación en esta

Revista. — 3. *Houssay, B. A.*: En publicación en esta Revista. — 4. *Mazzocco, P.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1940, 16, 35. C. R. Soc. Biol., Paris, 1940, 134, 289. — 5. *Mazzocco, P.*: Rev. Soc. Argent. Biol. 1940, 16, 129. — 6. *Novelli, A.*: Rev. Soc. Argent. Biol., 1932, 8, 454; C. R. Soc. Biol., Paris, 1932, 111, 474. — 7. *Rugh, R.*: J. Exp. Zoölogy, 1935, 71, 163. — 8. *Samartino, G. T., Rugh, R.*: J. Exp. Zoölogy, 1945, 98, (2), 153. — 9. *Wright, P. A., Hisaw, F. L.*: Endocrinology 1946, 39, 247.

