

VALOR ACTUAL DE LAS REACCIONES GRAVIDICAS BIOLÓGICAS PARA EL DIAGNOSTICO DEL EMBARAZO *

Por el Dr. E. AGUIRRE PEQUEÑO,
académico correspondiente. Monterrey, N. L.

El sapo macho mexicano (*Bufo valliceps* Wiegmann) como animal reactivo en el diagnóstico precoz del embarazo.

Constituye para mí un extraordinario honor a la vez que un gran placer el venir desde la provincia lleno de entusiasmo, no a presentar un trabajo original, sino a recibir de vosotros la crítica sincera y constructiva, el consejo sabio y la buena orientación para el futuro desarrollo de mi plan de trabajo; en suma, mi propósito sólo tiene un ideal, aquel que a todos nos inspira y que consiste en tratar, al alcance de nuestras posibilidades, de contribuir al adelanto científico de nuestro país, en bien de la humanidad.

Desde hace 2 años me he venido ocupando con extraordinario interés de los batracios en el diagnóstico biológico del embarazo, habiendo publicado por primera vez en México, en el número 559 de la Revista Medicina, de julio de 1948, número de aniversario, una nota ilustrada con algunas fotografías, titulada "Prueba para el Diagnóstico del Embarazo, utilizando la Rana *Xenopus laevis*."

Posteriormente, abiertos nuevos horizontes, como resultado de los trabajos de Carlos Galli Mainini, colaborador del distinguido investigador argentino, el Dr. Bernardo A. Houssay, miembro honorario de esta Academia, me apresuré a verificar estudios comparativos entre los *Xenopus laevis* y los batracios de la localidad (rana macho, rana hembra; sapo hembra y sapo macho).

* Leído en la sesión del día 27 de abril de 1949.

En la actualidad creo que no nos colocamos fuera de la ciencia al afirmar que en este último, el sapo macho (*Bufo valliceps* Wiegmann) se ha encontrado una respuesta positiva semejante a la que en Argentina anunciara Galli Mainini hace apenas 2 años en el *Bufo arenarum* Hensel.

Sería muy conveniente que, tomando en cuenta la sencillez de la técnica empleada, se hicieran pruebas en diversos lugares de la República a fin de catalogar rápidamente las especies afines a la reacción a que nos venimos refiriendo.

Es indudable que el *Xenopus laevis* da magníficos resultados para la prueba del embarazo normal y patológico, pero las dificultades económicas y climatológicas que por el momento se presentan para su adquisición y desarrollo, hacen que en nuestro medio no se use en gran escala como se está utilizando en diversas partes del mundo y en particular en los Estados Unidos.

Es muy probable que el prolongado cautiverio en el que nos vemos obligados a someter a estos batracios tan útiles, traiga como consecuencia algunas ligeras fallas en las pruebas. En no raras ocasiones, las pruebas comparativas verificadas con orina de embarazada de 2 meses resultaron positivas en nuestro sapo local (*Bufo valliceps*) y en cambio en el *Xenopus laevis* dieron respuesta negativa.

El siguiente estudio es un intento en que se siguen los métodos practicados por Galli Mainini en sus investigaciones en el sapo macho (*Bufo arenarum* Hensel).

MATERIAL Y METODOS

Animal reactivo: (El *Bufo valliceps* Wiegmann de N. L.) *

La especie de sapo *Bufo valliceps*, fué establecida por Wiegmann en 1833.

La distribución geográfica de la especie *Bufo valliceps* Wiegmann, abarca una extensa zona en la vertiente atlántica de Norte y Centroamérica, desde Louisiana y Texas hasta Costa Rica. En la República Mexicana ha sido encontrado en los Estados de Campeche, Chiapas, Coahuila, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí,

* La determinación de la especie de sapo fué verificada por el Prof. Martín del Campo, del Inst. de Biol. de la U.N.A.

Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. Por lo que se refiere a su existencia en el Estado de Nuevo León, fué puesta de manifiesto desde mediados del siglo pasado, cuando J. N. Couch lo recolectó en Santa Catarina el año de 1853; posteriormente, Nelson y Goldman obtuvieron la misma especie en el Cerro de la Silla en 1902.

Además de la mencionada, se han encontrado en el Estado de Nuevo León otras cuatro especies de *Bufo*: *B. horribilis*, *B. compáctilis*, *B. débilis* y *B. punctatus*. (Emith, Hobart M. y Taylor, Edward H.: An annotated checklist and key to the Amphibia of Mexico. U. S. Nat. Mus., Bull. 194. 1948.)

Se usaron sapos machos de peso variable entre 60 y 80 gramos.

La mayoría de los sapos fueron capturados y mantenidos en cautiverio durante algunos meses. En algunas reacciones se usaron sapos que habían sido inyectados con resultados positivos una semana antes. Los batracios fueron mantenidos en acuarios en los que solo se mantuvo un ambiente húmedo.

A.—Material

1. 1 probeta de 250 c.c.
2. 1 embudo de separación con capacidad de 300 c.c.
3. 1 soporte metálico.
4. 2 vasitos de precipitado de 50 c.c.
5. 4 tubos de centrifuga de 15 c.c.
6. 5 pipetas graduadas de 1 c.c.
7. Agitadores de vidrio.
8. 1 centrifuga.
9. 1 ventilador.
10. 1 cápsula de porcelana de 100 c.c.
11. Probeta de 10 c.c.
12. 1 comparador de Ph. para el papel de nitrazina de Squibb.

B.—Productos Químicos

1. Acido acético glacial.
2. Acetona.
3. Eter.
4. Acido sulfosalicílico al 10%.
5. Papel de nitrazina de Squibb.

TECNICA

Se recolectan 100 c.c. de orina matutina de los cuales se utilizan 80 c.c., los que se colocan en la probeta y se les agrega gota a gota de ácido acético glacial hasta obtener un Ph. de 4.5 (con papel de nitrazina); entonces se agregan otras 2 gotas, para aproximarse a un Ph. de 3.5.

La orina acidificada se coloca en el embudo de separación y se le agregan 160 c.c. de acetona. Se cierra el embudo y se agita enérgicamente durante dos minutos, después de los cuales el embudo se coloca en un soporte y se deja reposar la mezcla durante 15 minutos, tiempo suficiente para la formación del precipitado.

Se separa el precipitado abriendo la llave del embudo (se obtienen alrededor de 40 c.c.). El líquido sobrenadante se guarda para destilar. El precipitado se centrifuga descantándose el líquido sobrenadante y se lava dos veces con pequeñas cantidades de éter (alrededor de 20 c.c.). El precipitado así lavado se coloca en la cápsula de porcelana y se seca abajo de un ventilador. Una vez seco el precipitado se vierten en la cápsula 2 c.c. de agua destilada y la mezcla así obtenida se bate cuidadosamente y se centrifuga.

El líquido sobrenadante se coloca en la probeta de 10 c.c. y se ajusta a un Ph. de 5.5 (papel de nitrazina) utilizando ácido sulfosalicílico al 10%. Cada c.c. de este concentrado equivalente a 40 c.c. de la orina completa.

Utilícese 1 c.c. del concentrado para cada inyección, dejando el restante para en caso de necesitarse como prueba de control o también puede utilizarse para inyectarse inmediatamente un segundo sapo. Si el material biológico es suficiente, es preferible utilizar dos sapos para cada prueba.

TECNICA DE LA INYECCION

Se prefiere inyectar en el saco linfático ventral o en los laterales del sapo, por ser éstos los más grandes. La inyección se practica en forma subcutánea por medio de una aguja corta de insulina. Un impulso firme y suave lleva la aguja a través del tejido conectivo en el espacio linfático. El líquido debe verse claramente a través de su recorrido bajo la piel. La manipulación se practica sin mayores dificultades.

ORINA INYECTADA

Se inyectó en el saco linfático lateral y a veces ventral de cada sapo 10 c.c. de orina de la mujer presuntamente embarazada. En todos los casos clínicos la amenorrea no pasó de 4 meses. En todas las reacciones, la orina fué recogida por la paciente en la misma mañana. Las orinas fueron inyectadas en la siguiente forma: Por una parte sin previa filtración, ajuste de Ph., concentración, etc.; y por otra, siguiendo el método de concentración descrito anteriormente. En una vez se usó suero sanguíneo de la presunta embarazada.

Todas las inyecciones de orina fueron efectuadas en las primeras horas de la mañana y los batracios mantenidos en sus acuarios especiales.

Simultáneamente con otra parte de las mismas orinas se efectuó la reacción en el *Xenopus laevis* y al mismo tiempo con rana macho y rana hembra de la localidad.

OBTENCION DE LA MUESTRA DE LA ORINA DEL SAPO

La orina fué obtenida del sapo mediante una pipeta introducida en el conducto anal, de un diámetro variable, aproximadamente del mismo que las de 1 c.c. (a veces fué usado un simple gotero). Para colectar la orina, el sapo se sostiene dorsalmente sobre la mesa, la pipeta se introduce a una profundidad no mayor de 0.5 a 1 cm. en el conducto anal y se mueve suavemente para adelante y para atrás hasta que se observa la penetración de una gota de orina.

Es de importancia que, cuando la pipeta se introduce en el conducto, el extremo de la misma se mantenga hacia arriba. Esta posición facilita la recolección de la orina. No se necesita más que una gota. Extrayendo esta pequeña cantidad, la vejiga no se vacía y en caso necesario podrán obtenerse nuevas muestras. En buen número de casos se observa la micción del sapo, ya espontánea al intentar el cateterismo o seguida al iniciar la maniobra.

OBSERVACION AL MICROSCOPIO

De la orina obtenida se deposita una gota sobre un porta examinando luego al microscopio en forma directa. No es necesaria la coloración ni

recurrir a ningún otro método complicado. Es conveniente que la iluminación no sea excesiva. De acuerdo con estas circunstancias los espermatozoides se observan en gran número, como pequeñas líneas negras agitadas por sus movimientos característicos. El flagelo del espermatozoide, en algunos elementos aparentemente invisibles, se identifica diafragmando un poco, o más sencillamente poniendo un cubre objetos a la gota de orina y usando objetivo seco fuerte.

No es raro observar, cuando por técnica defectuosa se ha introducido la pipeta un poco más de la longitud señalada, un buen número de flagelados y ciliados de variadas formas y tamaños, cuyos movimientos podrían dar lugar a dudas a quien no tenga alguna experiencia en la observación de los protozoarios intestinales comunes de los batracios.

TIEMPO DE OBSERVACION

En todas las reacciones efectuadas, el examen de la orina de los sapos se practicó a la hora, a las 2 horas, y periódicamente cada 3 horas después de la inyección. En ningún caso la duración de la reacción (intensa) se prolongó después de 24 horas.

Estaciones del año en que se verificaron las pruebas: Principalmente durante el pasado invierno y principios de la presente primavera.

RESULTADOS:

A continuación se expresan los resultados obtenidos:

Total de reacciones	50
Muertes a consecuencia de la inyección	0
Resultados comparables (con X.I.).	6
Resultados coincidentes	5
Resultados no coincidentes	1
Positivo en el sapo y negativo en el <i>Xenopus laevis</i> .	

Resultados positivos observados a la 1, 2 y 3 hs. Los 50 casos.

Positivos a la hora	4
Positivos a las 2 horas	13
Positivos a las 3 horas	33

Tiempo máximo de presencia de los espermatozoides en la orina de los 50 sapos: 14 a 18 hs. (con abundantes espermatozoides).

Aún a las 24 horas sólo pequeñas cantidades de espermatozoides fueron observadas.

CONTROLES

Como control de los resultados, fueron inyectados 20 sapos, cuyos resultados siempre negativos se enumeran a continuación:

Niños prepúberes: varones 5, mujeres 5.

Adultos normales con vida sexual activa: varones 2, mujeres 2.

Mujeres en menopausia con sintomatología, 3.

Hombres de más de 50 años, 2.

Mujer adulta hipertiroidea, 1.

Circunstancias desfavorables me impidieron llevar a cabo controles mediante el uso de los clásicos preparados hormonales, dejando todo en arreglo para verificar dichas pruebas en correcta escala, como complemento al presente trabajo.

DISCUSION

Tomando en cuenta los resultados obtenidos y anteriormente expuestos, tal parece que la orina de mujer embarazada tiene la capacidad de producir el desprendimiento y la migración de los espermatozoides del sapo macho mexicano *Bufo valliceps*, empleado como animal reactivo. Por la negatividad de la reacción en los controles y por el paralelismo positivo de los resultados obtenidos con el *Xenopus laevis*, considero de importancia estos hechos para insistir en la conveniencia de verificar pruebas semejantes en los diversos estados de nuestro país.

Soy el primero en reconocer que las condiciones experimentales en que he intentado llevar a cabo el presente estudio, carecen en gran parte de método y de la fundamental estadística. En suma, solo me estoy concretando a llamar la atención acerca de la importancia del tema y a la vez de señalar una especie de sapo mexicano (*Bufo valliceps* Wiegmann) nueva en la reacción de Galli Mainini.

RESUMEN

Tomando en cuenta la literatura respectiva, podemos afirmar que se recalca por primera vez en México la importancia del valor actual de las reacciones gravídicas biológicas para el diagnóstico del embarazo y se da a conocer el descubrimiento de una especie de sapo macho mexicano (*Bufo valliceps* Wiegmann), que responde en múltiples ocasiones en forma semejante como el *Bufo arenarum* Hensel de Argentina.

Justo es mencionar los conceptos vertidos por Galli Mainini y transcritos en el "Journal of Clinical Endocrinology" de septiembre de 1947, por Enrique B. del Castillo, Jefe del Servicio de las Enfermedades Endócrinas del Hospital de Rivadavia, en Buenos Aires, Argentina, en los cuales se advierte su atinada sugestión, consistente en la conveniencia de verificar las investigaciones tendientes a descubrir nuevas especies de sapos, que respondan en forma verdadera como el *Bufo arenarum* Hensel, y el interés general que reportaría el encontrar dichas especies.

Las reacciones verificadas en el sapo mexicano se basan en el hecho de que, tanto las inyecciones de orina como de suero en casos de embarazo, tienen la propiedad de provocar la migración de espermatozoides desde el testículo hasta la vejiga del sapo y que pueden observarse bajo el microscopio en una gota de orina extraída por cateterismo. Se recalca a la vez el importante fenómeno consistente en la respuesta positiva del sapo mexicano ante la negativa del *Xenopus*, previamente testado (de 3 a 4 meses de cautiverio), en un caso de embarazo de 2 meses.

Experiencias comparativas con ranas machos de la localidad resultaron siempre más intensas en el macho sapo, que en el macho rana.

De las pruebas comparativas verificadas con ranas hembras de la localidad, a mi juicio y por el momento, no vale la pena tomarlas en cuenta, fundándose en las múltiples fallas presentadas por los batracios mencionados.

En suma, no pretendo haber encontrado una especie nueva de sapo de aplicación práctica inmediata, sino simplemente el señalar una especie de nuestro medio, en la cual continuaré las investigaciones en gran escala lo más pronto posible, a fin de rendir en un futuro no lejano el resultado de los experimentos.

CONCLUSIONES

Primera.—La inyección de 1 c.c. de concentración, o de 10 c.c. de orina de mujer embarazada en el sapo macho mexicano *Bufo valliceps* Wiegman, produjo la aparición de espermatozoides en su orina.

Segunda.—Efectuadas simultáneamente las reacciones en el sapo mexicano *Bufo valliceps* y en algunos *Xenopus laevis* hembras de 3 a 4 meses de cautividad, en un caso positivo de embarazo de 2 meses, el sapo dió resultado positivo y negativo el *Xenopus laevis* hembra.

Es importante señalar que 2 inyecciones de suero de 0.5 cada hora del mismo caso del embarazo de dos meses, dió respuesta positiva en el sapo macho (*Bufo valliceps*) a las 3 horas.

Tercera.—La aparición de espermatozoides en la orina del sapo tuvo lugar dentro de las 3 horas.

Cuarta.—La duración de la presencia de abundantísimos espermatozoides en la orina de los sapos examinados fué no mayor de 24 horas.

Como se asentó en el resumen, estos datos no tienen la pretensión de haber determinado lógicamente el valor práctico de una reacción, sino simplemente el de dar a conocer una especie nueva de sapo mexicano (*Bufo valliceps* Wiegmann), en la que de continuar los estudios de investigación, podrá responder no sólo a nuestras aspiraciones prácticas, sino también a determinar nuevos horizontes en las investigaciones médico-biológicas.