

# ALGUNOS ASPECTOS EXPERIMENTALES SOBRE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA

MAURICIO SAN MARTIN F.

## INTRODUCCIÓN

Desde 1940, en que se fundó en Huancayo el Laboratorio del Instituto de Biología Andina, hemos estado interesados en estudios de fisiología de la reproducción en relación con la altura, y, a medida que progresábamos en nuestra investigación, resaltaba cada vez más la necesidad de profundizar esos trabajos, tanto en el campo de la endocrinología como de la embriología precoz, puntos que comenzamos a estudiar en 1947 con experiencias al nivel del mar y que tenían como fin el servirnos de base de comparación para futuros trabajos en la altura, pero los resultados que venimos obteniendo en estas experiencias, junto con la difusión y uso de cada vez mayor, en la práctica diaria de la medicina, no sólo de productos ganadotrópicos tanto de origen humano como equino, sino también de productos hormonales del ovario, nos ha inducido a presentar esta tesis con la esperanza que pueda ser una contribución que sirva para dilucidar conceptos en el empleo de esos productos hormonales.

Nuestra tesis es exclusivamente experimental y está basada en experiencias realizadas en conejas, por ser este un animal ideal para estudios de la actividad reproductiva. El plan general que hemos seguido es el siguiente :

- I. Consideraciones generales.
- II. Inducción del crecimiento folicular.
- III. Inducción de la ovulación.
- IV. Transporte del espermatozoide y viabilidad de los gametos.
- V. Efectos de las hormonas ováricas sobre el desarrollo embriológico precoz.
- VI. Conclusiones.

Los métodos empleados serán presentados en sus capítulos correspondientes junto con los resultados obtenidos y discusión de los mismos.

## I. CONSIDERACIONES GENERALES

A) *Animal experimental.*

La coneja es un animal que puede tener actividad en cualquier época del año, pero se diferencia de la mayoría de las otras especies por carecer de ciclos sexuales periódicos. Llegada a la madurez sexual, que se presenta más o menos a los seis meses de edad, se produce el estrous o período en que acepta al macho, correspondiendo este momento al final de la fase proliferativa de las especies de evolución espontánea y de actividad sexual cíclica. En ausencia de macho, el estrous de la coneja se prolonga por 30 o más días y los folículos que llegaron a la madurez, cuando se inició el estrous, sufren modificaciones atresicas para ser reemplazados por nuevos folículos maduros que a su vez experimentarán cambios regresivos, repitiéndose este fenómeno durante todo el estrous sin que se llegue a producir la ovulación, después de lo cual, el animal pasa a un período de anestrous, variable de duración y que puede fluctuar de 16 a más de 60 días, para repetir nuevamente el estrous (1).

Cuando una hembra en estrous copula, se induce la ovulación que se produce más o menos 10 horas después del estímulo, estableciéndose la preñez que abarca 30 a 32 días si el coito es fértil, en el caso contrario, se presenta un período de anestrous de 16 días de duración, período conocido como "seudopreñez" y que en realidad no es otra cosa que la fase secretoria de los animales de ovulación espontánea y de actividad sexual cíclica. Inmediatamente después de la preñez o de la "seudopreñez" el animal vuelve a entrar en un período de estrous (2, 3).

El mecanismo hormonal que controla esta actividad sexual en la coneja, esquemáticamente se le puede resumir como la consecuencia de las interacciones hormonales entre dos glándulas: la hipófisis y las gónadas. En el ovario el crecimiento de la oogonia y formación de folículos inmaduros con esbozo de antrum folicular, parece que es el resultado de la acción de una hormona embrionaria secretada por el epitelio germinal, pero una vez que los folículos presentan este esbozo de antrum folicular caen bajo el estímulo de una hormona del lóbulo anterior de la hipófisis, el F.S.H. u hormona estimulante del crecimiento folicular que los induce a crecer (4, 5, 6 y 7). Este estímulo, en su iniciación, abarca un número grande de folículos, pero a medida que el

crecimiento progresa, muchos se quedan rezagados y sufren procesos regresivos, llegando a completar su madurez el número de folículos que corresponde a la ovulación múltiple de la especie. Simultáneamente al crecimiento folicular, se produce en las trompas, útero, vagina y mamas, una serie de modificaciones por la acción de la hormona folicular, constituyéndose la fase proliferativa, similar a la de las especies de actividad sexual cíclica y cuando los folículos completan su crecimiento y se alcanza el máximo de secreción de productos estrogénicos, se presenta el estrous. En este estado y a diferencia de las especies de ovulación espontánea, se detiene el ciclo y no se produce la ovulación hasta que se realice un coito, el cual por vía nerviosa estimulará a la hipófisis en la secreción de un segundo factor, el L.H. u hormona luteinizante, que actuará junto con el F.S.H. sobre los folículos que alcanzaron la madurez, en forma tal, que en pocas horas les hace sufrir un crecimiento y formación de líquido folicular tan intenso que la presión interna del folículo vence la resistencia de sus paredes, produciéndose la ovulación a consecuencia de la ruptura folicular (5, 7, 8 y 9).

Después de producida la ovulación, el factor L.H. continúa actuando y por efecto de su acción, el folículo roto se transforma en cuerpo amarillo, el cual al ser estimulado por la luteotropina u hormona lactogénica inicia la secreción de progesterona, la cual al ir en aumento ejercerá una acción inhibitoria sobre la hipófisis en la secreción de L.H. y luteotropina y por el contrario, la estimulará a producir F.S.H. que a su vez, actuando sobre el ovario induce el crecimiento folicular que terminará con la producción de un nuevo período de estrous (5, 7 y 10).

El hecho de que en la actividad sexual de la coneja no se produzca la ovulación, sino como resultado de un estímulo inductor, la convierte en un animal experimental ideal para estudios de la actividad reproductiva, ya que el investigador puede hacer una diferenciación precisa entre la fase proliferativa y la secretoria, fuera de que conoce el momento en que el animal ovula. Es por estas razones que en nuestros trabajos, que se basan principalmente en la inducción, tanto del crecimiento folicular como de la ovulación, seleccionamos a esta especie como animal experimental.

Merece punto aparte el mencionar que todos los animales usados en el curso de nuestras experiencias han sido nacidos y criados en el vivero del Laboratorio Cooperativo de Genética Experimental (Instituto de Biología Andina y Facultad de Medicina Veterinaria), siendo su origen 20 hembras y 3 machos que no tenían relación de parentesco entre sí y que a partir de esa fecha se han venido cruzando al azar de manera que la variación hereditaria prácticamente no ha sufrido modi-

ficación, pero eso sí, al ser mantenidos los animales bajo condiciones standards de higiene, alimentación, jaulas, etc., ha existido una tendencia a disminuir la variación ambiental y por lo tanto, lógicamente el grupo de animales usados en nuestros trabajos constituyen una población más homogénea que cualquier otra formada por animales de diferentes orígenes.

## B) *Productos hormonales*

Los productos hormonales empleados en nuestros ensayos se pueden considerar en dos grupos :

1. *Productos gonadotrópicos.*—Las hormonas gonadotrópicas se dividen en dos clases principales. Una, que deriva de tejidos hipofisarios y la otra, de tejidos coriónicos activos, pudiendo en este último caso ser extraídas de orina o sangre de mujeres grávidas y también de sangre de yeguas preñadas. Estas gonadotropinas coriónicas difieren en su acción, predominando el efecto estimulante del crecimiento folicular en las de origen equino y por el contrario, en las de origen humano predominaría el efecto luteinizante.

Ambos tipos de gonadotropinas coriónicas son las que hemos utilizado, correspondiendo el producto "Gestyl" de la casa N.V. Organon (Holanda) a las de origen equino y el "Pregnyl", del mismo productor, a las gonadotropinas de origen humano.

2. *Productos ováricos.*—Entre las hormonas ováricas, hemos empleado una suspensión de alfa-estradiol preparada por la casa Chicago Pharmacal Co (U.S.A.); una solución oleosa de progesterona pura cristalizada de los Laboratorios Abbott y una suspensión acuosa de cristales de estrona preparada por la misma casa productora.

Debemos mencionar que la casi totalidad de estos productos ováricos nos los ha proporcionado el Departamento de Investigaciones de los Laboratorios Lederle, American Cyanamid Company, quienes han tenido la gentileza de adquirirlos en otras casas productoras, ya que ellos no los producían.

## II. INDUCCIÓN DEL CRECIMIENTO

A) *Métodos*

1. *Animales controles o de crecimiento folicular natural.*—Los animales controles, sexualmente maduros y de edad que fluctuaba entre 6 y 7 meses, pertenecían a un grupo de hembras que se había mantenido aislado de machos por un período no menor de 30 días.

Probadas con machos vasectomizados, pero sin dejarlos copular, se separaban todas las que presentaban período de estrous, alcanzando un número de 20 animales, los cuales se trataron con pregnyl para inducir la ovulación, determinándose el crecimiento folicular por la suma de los puntos de ovulación más los folículos maduros que no habían ovulado.

2. *Animales de crecimiento folicular inducido.*—Del mismo grupo que los controles, se seleccionaron animales en anestrous, en estrous y de estos últimos, a una parte le indujo la fase secretoria o pseudopreñez por monta con machos vasectomizados. Todos los animales se trataron con administración subcutánea de Gestyl, a diferentes dosis, cada 24 horas por tres días consecutivos.

B) *Resultados*.

Los resultados obtenidos están consignados en los cuadros a continuación:

CUADRO I  
CRECIMIENTO FOLICULAR NATURAL

Marca conejas	O V A R I O S		
	Izquierdo	Derecho	
A— 1	4	7	
A— 2	3	3	
A— 3	8	4	
A— 4	4	4	
A— 5	1	4	
A— 6	3	6	
A— 7	10	6	
A— 8	1	7	
A— 9	4	5	
A—10	4	3	
A—11	6	4	
A—12	4	3	
A—13	5	4	
A—14	4	5	
A—15	4	5	
A—16	3	5	
A—17	4	3	
A—18	0	7	
A—19	3	5	
A—20	2	6	
Totales	20	77	93
%		45.03	51.92
Promedio		3.85	4.80
Promedio total por animal			8.65
Desviación Standard			1.90

## CUADRO II

## CRECIMIENTO FOLICULAR INDUCIDO EN ANESTROUS

Marca Conejas	Gestyl dosis total	Ovarios		Total grupo	Promedio por animal
		Izquierdo	Derecho		
B— 1	15 U.I.	1	3		
B— 2	" "	1	4		
B— 3	" "	1	3		
B— 4	" "	7	3		
B— 5	" "	3	6		
B— 6	" "	3	1	36	6.00
B— 7	30 U.I.	3	4		
B— 8	" "	3	0		
B— 9	" "	5	2		
B—10	" "	2	5		
B—11	" "	2	7		
B—12	" "	1	7	41	6.83
B—13	60 U.I.	4	3		
B—14	" "	3	4		
B—15	" "	12	8		
B—16	" "	14	8		
B—17	" "	0	8		
B—18	" "	5	9	78	13.00
B—19	90 U.I.	8	7		
B—20	" "	16	15		
B—21	" "	12	15		
B—22	" "	10	8		
B—23	" "	2	5		
B—24	" "	4	8	113	18.83
B—25	120 U.I.	18	11		
B—26	" "	21	22		
B—27	" "	17	11		
B—28	" "	20	23		
B—29	" "	10	9		
B—30	" "	9	13	184	30.66
B—31	150 U.I.	29	26		
B—32	" "	26	30		
B—33	" "	22	16		
B—34	" "	15	18	182	45.50
B—35	200 U.I.	28	30		
B—36	" "	36	31		
B—37	" "	31	29		
B—38	" "	22	19	226	56.50

## CUADRO III

## CRECIMIENTO FOLICULAR INDUCIDO EN ESTROUS

Marca Conejas	Gestyl dosis total	Ovarios		Total grupo	Promedio por animal
		Izquierdo	Derecho		
B-39	150 U.I.	20	19		
B-40	" "	13	16		
B-41	" "	18	13	99	33.0
B-42	200 U.I.	16	17		
B-43	" "	19	18		
B-44	" "	22	15	107	35.66

## CUADRO IV

## CRECIMIENTO FOLICULAR INDUCIDO EN FASE SECRETORIA

Marca Conejas	Gestyl dosis total	Días fase secretoria al induct. ovul.	Ovarios				Total grupo	Promedio por animal
			Izq.		Der.			
			F.	C.A.	F.	C.A.		
B-45	200 U.I.	6	5	5	7	1		
B-46	" "	"	6	4	9	5	27	
B-47	400 U.I.	6	42	3	38	4		
B-48	" "	"	37	3	39	2	153	
B-49	800 U.I.	6	46	4	33	3		
B-50	" "	"	40	4	39	2	158	

F. = Folículos en periodo preovulatorio.

C.A. = Cuerpos amarillos presente.



## C) Interpretación.

El crecimiento de los folículos con esbozo de antrum folicular, bajo el estímulo del factor hipofisiario F.S.H. (11, 12), corresponde a la fase proliferativa del ciclo sexual, siendo factible el inducir esta fase por tratamiento con extractos del lóbulo anterior de la hipófisis y con suero de yeguas preñadas que contiene una mezcla de gonadotropinas en la que predomina el factor estimulante del crecimiento folicular (13, 14, 15 y 16).

En el cuadro I se puede apreciar el número de folículos que maduran en forma natural durante una fase proliferativa, obteniéndose, en un total de 20 conejas, un promedio de 8.65 folículos, con predominio del ovario derecho sobre el izquierdo, ya que el 54.92% de los folículos corresponden al primero y 45.08% al último.

El tratamiento estadístico de estas diferencias de crecimiento folicular entre los dos ovarios, usando el método de comparación de dos grupos formados por igual número de individuos y probando la hipótesis de nulidad, según los valores de "t" (17) nos da :

Ovario	Número Determinaciones	Grados Libertad	Promedios	Suma Cuadrados
Izquierdo	20	19	3.85	395
Derecho	20	19	4.80	493
Suma = 38		Diferencia = .95		Suma = 891

$$\text{Variancia} = 891/38 = 23.44$$

$$\text{Desviación standard del promedio} = \sqrt{2 (23.44)/20} = 1.53 \text{ folículos}$$

$$t = .95/1.53 = .62$$

$$P > 5\%$$

Como la probabilidad del valor de t es mayor del 5%, estadísticamente se acepta que la diferencia entre los ovarios, en relación al número de folículos, son variaciones que se puede producir al azar dentro de una población.

La inducción del crecimiento folicular puede realizarse en cualquier fase del ciclo sexual (18 al 24-28). Cuando conejas en anestrous son tratadas con diferentes cantidades de gonadotropinas equinas, se obtiene un crecimiento folicular que está en relación directa con la cantidad administrada. Si observamos los resultados de los cuatro 1 y 2, tenemos que :

Cantidad de Gestyl	Promedio folículos Maduros por animal	Número de animales
—	8.65	20
15 U.I.	6.00	6
30 U.I.	6.83	6
60 U.I.	13.00	6
90 U.I.	18.83	6
120 U.I.	30.66	6
150 U.I.	45.50	4
200 U.I.	56.50	4

Es decir, que a dosis altas de Gestyl corresponde mayor número de folículos que maduran, pero dosis totales de 15 y 30 U.I., dan cantidades menores que las obtenidas con los animales de crecimiento folicular natural y como con dosis de 60 U.I. ya se obtienen cifras que sobrepasan a los animales controles, se puede pensar, que entre 40 a 50 U.I. de Gestyl se encuentra la dosis necesaria para inducir crecimiento folicular semejante al natural. Con cantidades mayores a 60 U.I. se logra un crecimiento folicular exagerado, llegando en el caso de 200 U.I., a sextuplicar los resultados obtenidos en los animales controles. Observaciones sobre esta respuesta exagerada del ovario ante el estímulo del factor F.S.H., hipofisiario o coriónico, han sido hechas en la coneja, vaca, oveja, etc., (23-25-26-30-29-31-32-34-36-37).

El tratamiento estadístico de esta respuesta ovárica, ante dosis variables de Gestyl, usando el análisis de variancia al comparar más de dos grupos con número distinto de individuos, nos (27) da :

Causas de Variación	Grados Libertad	Suma Cuadrados	Cuadrado Promedio
Total individuos	37	12957	—
Promedios de ovulación	6	10837	1811
Ovulos del mismo grupo	31	2090	67.4

$$F = 1811/67.4 = 26.8$$

De la tabla de distribución de F, considerando 6 grados de libertad en la línea horizontal y 31 en la vertical, se obtiene para 5% un valor de 2.41 y para 1% de 3.445 y como nuestro resultado sobrepasa a esta última cifra su probabilidad será mucho menor de 1%, lo cual nos indica, que las diferencias observadas entre los grupos tratados con diferentes

dosis de Gestyl, no son variaciones al azar dentro de una población, sino un efecto del tratamiento  $\alpha$  que fueron sometidos esos animales.

Al calcular el coeficiente de regresión, de los promedios de crecimiento folicular en relación a la dosis de Gestyl empleada, tenemos :

Unidades Gestyl		Promedio foliculos		Estimación	Desviación
X	X <sup>2</sup>	Y	XY	$\hat{Y} = .273 X$	$Y - \hat{Y}$
15	225	6.00	90.0	4.095	1.905
30	900	6.83	204.9	8.190	-1.360
60	3600	13.00	780.0	16.380	-3.380
90	8100	18.83	1694.7	24.570	-6.740
120	14400	30.66	3679.2	32.760	-2.100
150	22500	45.50	6825.0	40.950	4.550
200	40000	56.50	11300.0	54.600	1.900
665	89725	177.32	24533.8		
Coeficiente de regresión = $24533.8/89725 = .273$					

En otras palabras, cada promedio de crecimiento folicular aumenta en relación a su correspondiente dosis de Gestyl, siendo cantidades altas de este producto, las que tienen más influencia.

Si se calcula el porcentaje de maduración folicular por ovario, de los datos consignados en el cuadro II, tenemos :

PORCENTAJE DE FOLICULOS MADUROS POR OVARIO		
Dosis Gestyl	Izquierdo	Derecho
15 U.I.	44.44	55.56
30 U.I.	39.02	60.98
60 U.I.	48.71	51.29
90 U.I.	46.01	53.99
120 U.I.	51.36	48.64
150 U.I.	51.09	48.91
200 U.I.	51.76	48.24

Con estos porcentajes se puede ver que entre 15 y 90 U.I. de Gestyl aparentemente hay un mayor crecimiento folicular en el ovario derecho, tal como lo hemos observado en el crecimiento folicular natural, pero con dosis más altas sería el ovario izquierdo el que tienda a predominar.

Al hacer el análisis estadístico de estas diferencias entre los dos ovarios, usando el valor "t" al comparar dos grupos de igual número de individuos, obtenemos :

Ovario	Número de determinaciones	Grados libertad	Promedios	Suma de cuadrados
Izquierdo	38	37	11.21	8482
Derecho	38	37	11.42	7996
		Suma = 74	Diferencia = .21	Suma = 16478

$$\text{Variancia} = 16478/74 = 222.6$$

$$\text{Desviación standard} = \sqrt{222.6/38} = 3.4$$

$$"t" = .21/3.4 = 0.06$$

$$P = > 5 \%$$

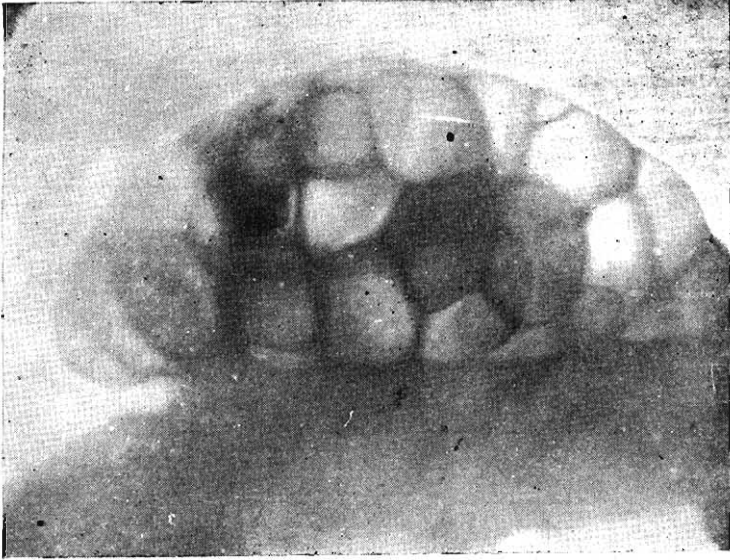
Esta probabilidad alta del valor de "t" nos indica que la diferencia entre los ovarios, en relación al crecimiento folicular, es una variación que se puede producir al azar dentro de una población.

Cuando la inducción del crecimiento folicular se hace en conejas en estrous (Cuadro III), se observa una disminución en el número de folículos que maduran y comparándolas con los animales en anestrous, tenemos :

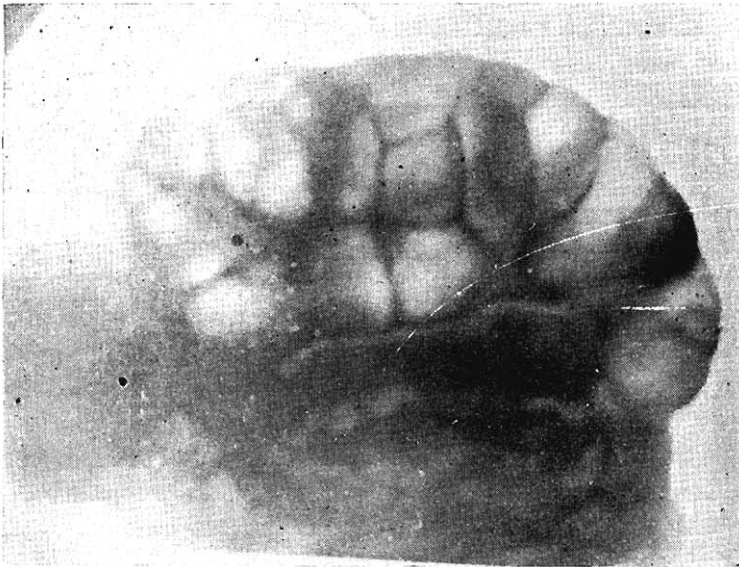
Dosis Gestyl	Promedio de crecimiento	
	En anestrous	En estrous
150 U.I.	45.50	33.00
200 U.I.	55.25	35.66

Esta reacción tal vez se pueda explicar si aceptamos que los ovarios son más sensibles al estímulo gonadotrópico en el comienzo de la fase proliferativa, caso de los animales en anestrous, sensibilidad que disminuiría al finalizar esta fase que culmina con la producción del estrous. Esta disminución de la respuesta ovárica se acentúa aún más, cuando el estímulo se practica en la fase secretoria, en donde tenemos un promedio de 13.50 folículos por animal al inyectar una dosis total de 200 U.I. de Gestyl (Cuadro IV), resultado que tiende a confirmar la idea de una menor sensibilidad ovárica en la fase secretoria (24). Dosis mayores de Gestyl (400 y 800 U.I.), serían capaces de vencer esta sensibilidad disminuida, ya que se obtienen un crecimiento promedio de 78 y 89 folículos respectivamente.

Un ejemplo típico de la respuesta exagerada del ovario ante dosis excesivamente altas de Gestyl se puede observar en las fotografías a continuación :



4X



4Y

Estas fotografías tomadas por transparencia corresponden a un animal en anestrous (B-36) tratado con 200 U.I. de Gestyl y nos muestran un estímulo sobre el crecimiento folicular, tan intenso, que el estroma ovárico ha quedado reducido a trabéculas interfoliculares.

## III. INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN

A) *Métodos.*

1. *Animales controles o de ovulación natural.*—Todos los animales que por razones de nuestro trabajo fueron sacrificados después de un estrous y ovulación natural, constituyen este grupo de control que suma un total de 131 animales.

2. *Inducción de la ovulación.*—Se hizo por inyección de gonadotropinas coriónicas humanas en la vena marginal de la oreja.

3. *Control de la ovulación.*—Este control se realizó, primero, contando los puntos de ovulación presentes en los ovarios y después, lavando las trompas y tercio superior de los cuernos uterinos con suero fisiológico que se recogía en lunas de reloj, para luego ser examinados al microscopio y ver si el número de óvulos recuperados correspondía a los puntos de ovulación.

B) *Resultados.*

Los resultados obtenidos se pueden observar en los cuadros a continuación :

CUADRO V  
OVULACION NATURAL

Número de conejas	Ovarios	
	Izquierdo	Derecho
131	425	388
Porcentaje	51.04	48.96
Promedio	3.24	2.96
Promedio total por animal	6.20	
Desviación standard	1.35	

## CUADRO VI

## OVULACION INDUCIDA EN FOLICULOS DE CRECIMIENTO NATURAL

Marca	Dosis Pregnyl	Ovario Izquierdo			Ovario Derecho		
		P.O.	F.M.	F.H.	P.O.	F.M.	F.H.
A-1	Blanco	0	8	0	0	4	0
A-2	"	0	4	0	0	4	0
A-3	1 U.I.	0	3	0	0	3	0
A-4	" "	0	4	0	0	7	0
A-5	5 "	1	0	0	2	2	0
A-6	" "	2	1	0	5	1	0
A-7	15 "	5	5	0	4	2	0
A-8	" "	1	0	0	5	2	0
A-9	25 "	2	2	0	2	3	0
A-10	" "	3	1	0	3	0	0
A-11	50 "	6	0	0	2	0	2
A-12	50 "	4	0	0	3	0	0
A-13	100 "	5	0	0	4	0	0
A-14	" "	4	0	0	5	0	0
A-15	200 "	4	0	0	5	0	0
A-16	" "	3	0	0	5	0	0
A-17	400 "	4	0	0	3	0	0
A-18	" "	0	0	0	7	0	0
A-19	800 "	3	0	0	5	0	0
A-20	" "	2	0	0	6	0	0

P.O. = puntos de ovulación

F.M. = folículos maduros

F.H. = folículos hemorrágicos.

## CUADRO VII

## OVULACION ARTIFICIAL EN FOLICULO DE CRECIMIENTO INDUCIDO

Marca Conejas	Gestyl dosis total	Dosis Pregnyl	Ovario izquierdo			Ovario derecho		
			P.O.	F.M.	F.H.	P.O.	F.M.	F.H.
B- 1	15 U.I.	10 U.I.	3	0	0	1	0	0
B- 2	" "	" "	3	0	0	4	2	0
B- 7	30 "	" "	3	0	0	3	1	0
B- 8	" "	" "	3	0	0	0	0	0
B-13	60 "	" "	2	2	0	3	0	0
B-14	" "	" "	3	0	0	3	1	0
B-19	90 "	" "	0	8	0	0	7	0
B-20	" "	" "	4	12	0	5	13	0
B-	120 "	" "	3	11	4	0	10	2
B-26	" "	" "	3	17	1	4	16	2
B- 3	15 U.I.	50 U.I.	1	0	0	3	0	0
B- 4	" "	" "	4	2	1	2	1	0
B- 9	30 "	" "	2	0	0	5	0	0
B-10	" "	" "	5	0	0	2	0	0
B-15	60 "	" "	8	1	5	5	0	3
B-16	" "	" "	9	1	2	6	1	1
B-21	90 "	" "	5	0	7	5	4	6
B-22	" "	" "	9	1	0	6	0	2
B-27	120 "	" "	14	0	6	16	0	7
B-28	" "	" "	7	7	3	6	3	2
B- 5	15 U.I.	100 U.I.	1	0	0	3	0	0
B- 6	" "	" "	1	0	0	4	0	0
B-11	30 "	" "	1	0	0	7	0	0
B-12	" "	" "	2	0	0	7	0	0
B-17	60 "	" "	5	0	0	9	0	0
B-18	" "	" "	0	0	0	8	0	0
B-23	90 "	" "	3	1	0	6	2	0
B-24	" "	" "	2	0	0	5	0	0
B-29	120 "	" "	10	0	0	9	0	0
B-30	120 "	100 "	7	0	2	13	0	0

P.O. = puntos de ovulación

F.M. = folículos maduros

F.H. = folículos hemorrágicos.



## CUADRO VIII

INDUCCION DE OVULACION NATURAL Y ARTIFICIAL EN FOLICULOS DE  
CRECIMIENTO INDUCIDO

Marca Conejas	Gestyl dosis total	Dosis Pregnyl	Ovario izquierdo			Ovario derecho		
			P.O.	F.M.	F.H.	P.O.	F.M.	F.H.
B-31	150 U.I.	—	—	29	—	—	24	2
B-32	" "	—	—	25	1	—	30	—
B-33	" "	100 U.I.	18	2	3	13	—	2
B-34	" "	500 "	15	—	—	18	—	—
B-35	200 U.I.	—	—	27	1	—	30	—
B-36	" "	—	—	36	—	—	31	—
B-37	" "	100 U.I.	25	2	4	20	1	3
B-38	" "	500 U.I.	21	—	1	19	—	—

P.O. = puntos de ovulación

F.M. = folículos maduros

F.H. = folículos hemorrágicos.

## CUADRO IX

OVULACION INDUCIDA EN PERIODO DE ESTROUS

Marca Conejas	Gestyl dosis total	Dosis Pregnyl	Ovario izquierdo			Ovario derecho		
			P.O.	F.M.	F.H.	P.O.	F.M.	F.H.
B-39	150 U.I.	1500 U.I.	14	—	6	15	—	4
B-40	" "	1000 "	9	—	4	12	—	4
B-41	" "	500 "	3	4	12	7	2	6
B-42	200 U.I.	1500 U.I.	18	—	8	12	—	6
B-43	" "	1000 "	9	1	6	8	4	5
B-44	" "	500 "	10	7	5	6	5	4

P.O. = puntos de ovulación

F.M. = folículos maduros

F.H. = folículos hemorrágicos.

## CUADRO X

## OVULACION INDUCIDA EN SEUDO PREÑEZ

Marca Conejas	Gestyl dosis total	Dosis Pregnyl	Ovario izquierdo			Ovario derecho		
			P.O.	F.M.	F.H.	P.O.	F.M.	F.H.
B-45	200 U.I.	1500 U.I.	—	—	5	—	—	7
B-47	400 „	„ „	—	7	35	—	3	35
B-49	800 „	„ „	—	6	40	—	19	20
B-46	200 U.I.	3000 U.I.	6	—	—	9	—	—
B-48	400 „	„ „	25	3	8	30	4	5
B-50	800 „	„ „	29	1	10	28	—	11

P.O. = puntos de ovulación

F.M. = folículos maduros

F.H. = folículos hemorrágicos.

(') Interpretación.

La ovulación o ruptura del folículo, no parece ser sino la consecuencia del aumento de presión del líquido folicular, aumento, que se produce por un crecimiento exagerado del folículo maduro bajo la acción del L.H. en presencia del factor F.S.H. y que termina, venciendo la resistencia de las paredes del folículo (8 y 9).

En un total de 131 conejas de ovulación natural, hemos obtenido un promedio de 6.2 folículos rotos por animal (Cuadro V). Si analizamos estos resultados, vemos que al ovario izquierdo corresponde el 51.05% del total de ovulaciones y al derecho el 48.96%. El estudio estadístico de estas diferencias entre los dos ovarios, siguiendo el método de número igual de observaciones en dos grupos y buscando el valor de "t" nos da:

Ovario	Nº de animales	Grados libertad	Promedios	Suma de cuadrados
Izquierdo	131	130	3.24	1611
Derecho	131	130	2.96	1382
Suma = 260		Diferencia = .28	Suma = 2993	

$$\text{Variancia} = 2993/260 = 11.51$$

$$\text{Desviación standard} = \sqrt{2(11.51)/131} = .419$$

$$"t" = .28/.419 = .67$$

$$P = > 5 \%$$

El valor de "t" tiene una probabilidad mayor a 5%, lo cual nos indica que las diferencias de ovulación entre los dos ovarios se pueden producir al azar dentro de una población.

En el Capítulo II hemos visto que el promedio de folículos maduros es de 8.65 por animal; lo que nos indica, que el mecanismo ovulatorio falla en un cierto número de folículos, ya que nuestro promedio de ovulación es de 6.2. Para ciertos autores (7), la presencia de folículos maduros que no ovulan sería necesaria, pues los estrógenos secretados por estos, mantendrían el estímulo sobre la hipófisis para la secreción de L.H., pero lo que llama la atención en este respecto es que al inducir ovulación en folículos de crecimiento natural, existe según nuestros resultados, una relación entre el número de folículos que ovulan y la cantidad de L.H. inyectada.

En el Cuadro VI se observa que la ovulación es posible a partir de 5 U.I. de Pregnyl, gonadotropina coriónica humana, pero no en todos los folículos que alcanzaron su madurez, siendo 100 U.I. o más, las dosis que producen la ovulación de todos esos folículos. Estos resultados nos indican que normalmente existía un cierto número de folículos maduros que son, hasta cierto punto, refractarios a dosis relativamente altas del factor L.H., ya que con 50 U.I. aún se obtienen algunos que, aunque se muestran hemorrágicos, no llegan a ovular. Se ha demostrado (38, 39, 40) que los estrógenos aumentan la sensibilidad de la capa granulosa del folículo al estímulo luteinizante de las gonadotropinas de origen equino y que el factor L.H. no sólo aumentaría el número de folículos que responden al estímulo del F.S.H., sino que sería el responsable de la diferenciación de la teca interna, fuente estrogénica, lo cual nos plantea la posibilidad que los folículos que crecen hasta el período preovulatorio y no llegan a ovular, serían por defectos de diferenciación, poco sensibles a sufrir el crecimiento preovulatorio bajo el estímulo del L.H. en presencia del F.S.H. Sea o no cierta esta posibilidad, nuestros resultados muestran que sólo dosis exageradamente altas, de gonadotropina coriónica humana, son capaces de hacer ovular a todos los folículos de crecimiento natural que llegan al poderío preovulatorio.

Ya hemos visto que la dosis mínima capaz de inducir ovulación es de 5 U.I. de Pregnyl, pero otros autores (55) encuentran que con 15 U.I. de gonadotropinas standard sólo ovulan el 50% de los casos tratados, siendo necesario 35 U.I. para que la ovulación se produzca en el 100% de los animales. Estas diferencias sólo se pueden explicar por una sensibilidad distinta de los animales empleados en ambos trabajos, ya que los controles que hemos realizado inyectando 5 U.I. de Pregnyl a sapos machos, nos han dado reacciones negativas, resultados, que están de

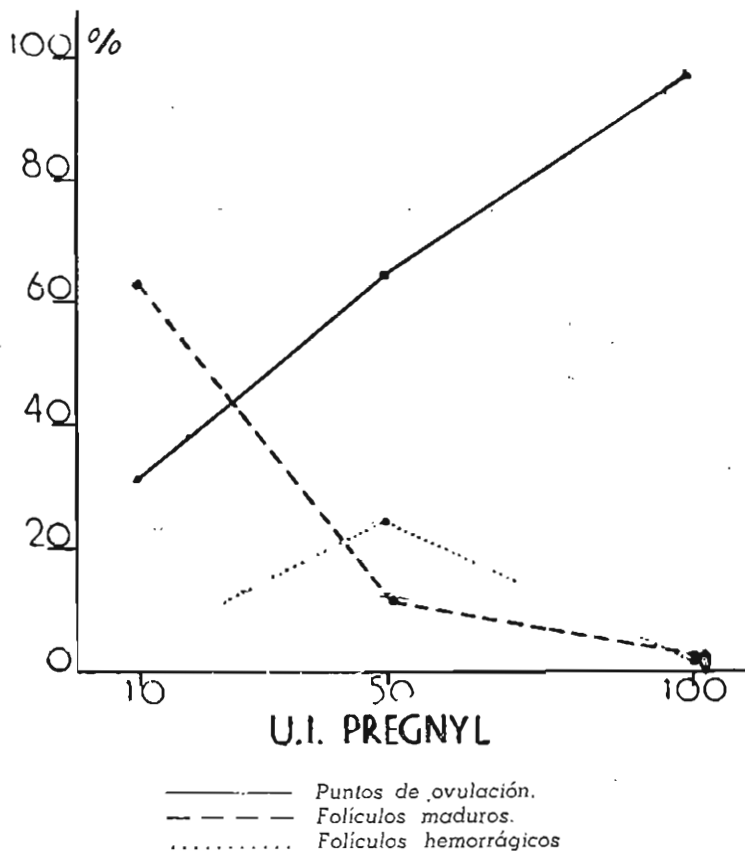
acuerdo con lo que se ha demostrado para esta especie (56) en la que sería necesario 10 U.I. de gonadotropinas coriónicas para producir el desprendimiento de los espermatozoides.

Cuando se estimula la ovulación, en folículos de crecimiento inducido en período de anestrous, Cuadro VII, se obtienen los porcentajes siguientes :

Grupo	Porcentaje ovulación			Porcentaje folículos maduros			Porcentaje folículos hemorrágicos		
	Izq.	Der.	Total	Izq.	Der.	Total	Izq.	Der.	Total
I									
10 U.I.	32.93	30.27	31.65	60.93	65.80	63.29	6.11	3.93	5.06
II									
50 U.I.	64.00	65.12	64.52	12.00	10.46	11.29	24.00	24.42	24.19
III									
100 U.I.	91.42	97.26	95.37	2.86	2.74	2.78	5.72	—	1.85

Con 10 U.I. de Pregnyl, sólo se logra que ovulen el 31.65% de los folículos que llegaron al período preovulatorio, porcentaje que sube a 64.52% al inyectar 50 U.I. y a 95.37% con 100 U.I. Al observar el Cuadro VII y en especial los animales tratados con 10 U.I. de Pregnyl, se puede ver, excepto en el B-19 que no ovuló, que la ruptura folicular se produce en número más o menos semejante, tanto en los animales de crecimiento folicular moderado, como en los de crecimiento exagerado, por el contrario, cuando se inyecta 100 U.I. de Pregnyl prácticamente hay ovulación de todos los folículos, sin distinción de la forma cómo se estimuló el crecimiento folicular. Al inyectar 50 U.I. de Pregnyl, se obtiene una situación intermedia entre estos dos extremos, ya que, hay ovulación total en los animales de crecimiento folicular moderado y parcial, en los de crecimiento exagerado, en los que se puede observar, junto con los puntos de ovulación, algunos folículos en período preovulatorio y otros, que no han ovulado, pero que se muestran hemorrágicos. Para algunos autores (41 y 42), los folículos hemorrágicos serían resultado de una hemorragia masiva intrafolicular que se produciría antes de inducir la formación de córpora lutea, cuando se emplean dosis altas de gonadotropinas, pero nuestros resultados tienden a demostrarnos que para inducir una ovulación total, sobre todo en los casos de crecimiento folicular exagerado, es necesario una cierta relación entre los factores F.S.H. y L.H., siendo los folículos hemorrágicos consecuencia de un predominio del factor F.S.H., ya que al elevar la cantidad de L.H., inyectando más Pregnyl, aumenta, a expensas de

los folículos que pudieron ser hemorrágicos y en estado preovulatorio, el número de folículos que ovulan, como se puede observar en la gráfica a continuación :

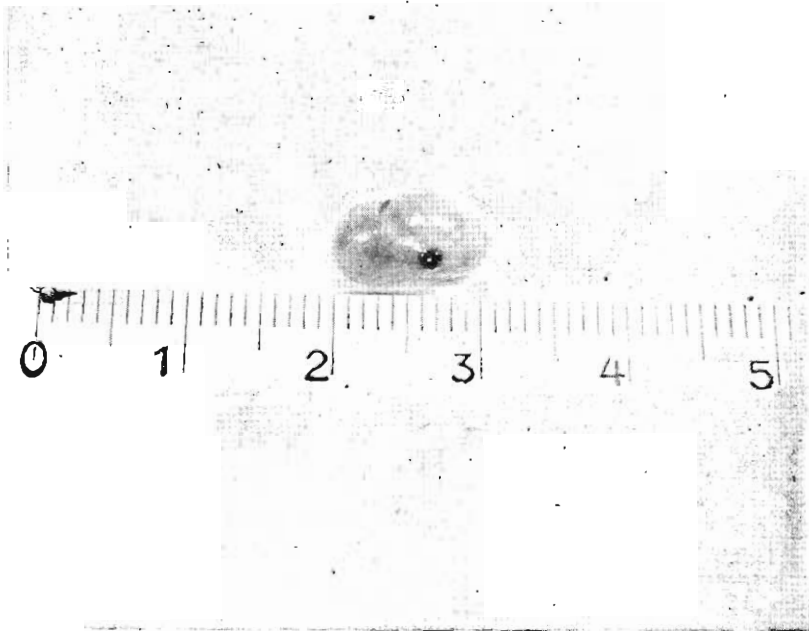


Esta relación estrecha, entre los factores F.S.H. y L.H., la volvemos a confirmar al analizar el cuadro VIII, donde vemos, que con el coito no se logra inducir la ovulación en hembras con crecimiento folicular exagerado, pero sí, al inyectar dosis altas de Pregnyl. Ya hemos visto, en el Capítulo II, que en las conejas en estrous parece que se presenta una respuesta ovárica menor ante el estímulo del factor F.S.H., fenómeno que se acentúa en la fase secretoria. Al inducir la ovulación en estas condiciones, cuadros IX y X, vemos que con dosis de 1500 U.I. de Pregnyl, hay ovulación parcial en los animales en estrous, en cambio, en los animales en fase secretoria esta cantidad de gonadotropinas coriónicas sería insuficiente para inducirla.

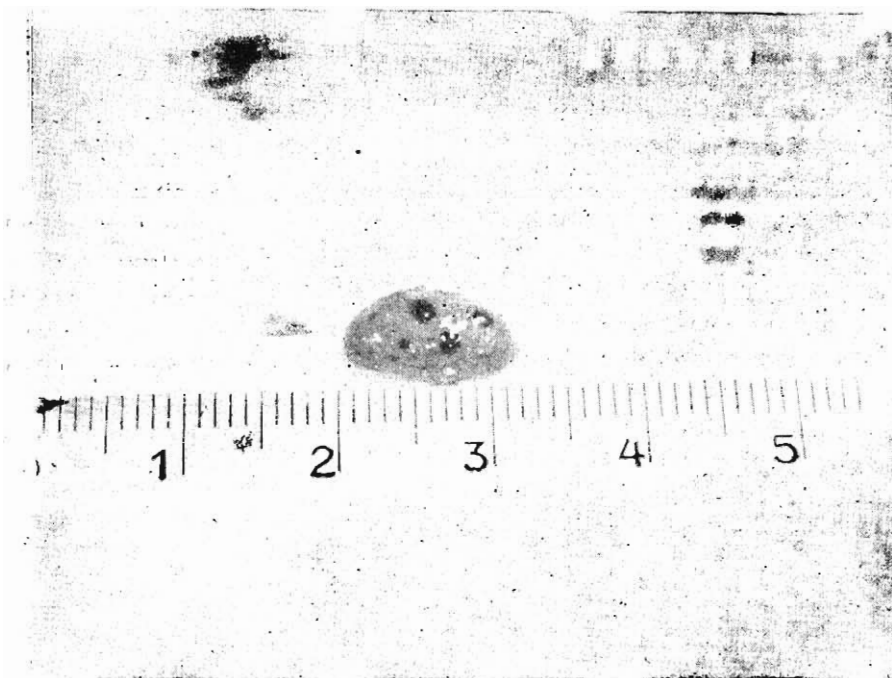
La posibilidad de estimular la ovulación, en cualquier momento del ciclo sexual, ha sido confirmada por varios autores (18, 24, 43) e inclu-

sive, hasta se ha logrado en ratones que estaban preñados (44), pero encontrando que hay una menor sensibilidad del animal cuando está en la fase secretoria, resultado que lo confirmamos al obtener ovulación con 3000 U.I. de Pregnyl y no, con 1500 U.I. del mismo producto. Estas observaciones, junto con las que hemos realizado con animales en estros, en los que 1500 U.I. de Pregnyl no inducen una ovulación total, reacción, que se obtiene con 100 U.I. en animales en anestrous, nos hacen pensar, que esta menor sensibilidad del ovario al estímulo gonadotrópico se inicia al final de la fase proliferativa y se va acentuando a medida que la fase secretoria progresa, siendo posiblemente los folículos de crecimiento natural en período preovulatorio y posteriormente, los cuerpos amarillos, los responsables de este estado refractario relativo de los ovarios al estímulo gonadotrópico, ya que dosis elevadas de estos productos, desencadenan el crecimiento folicular y ovulación.

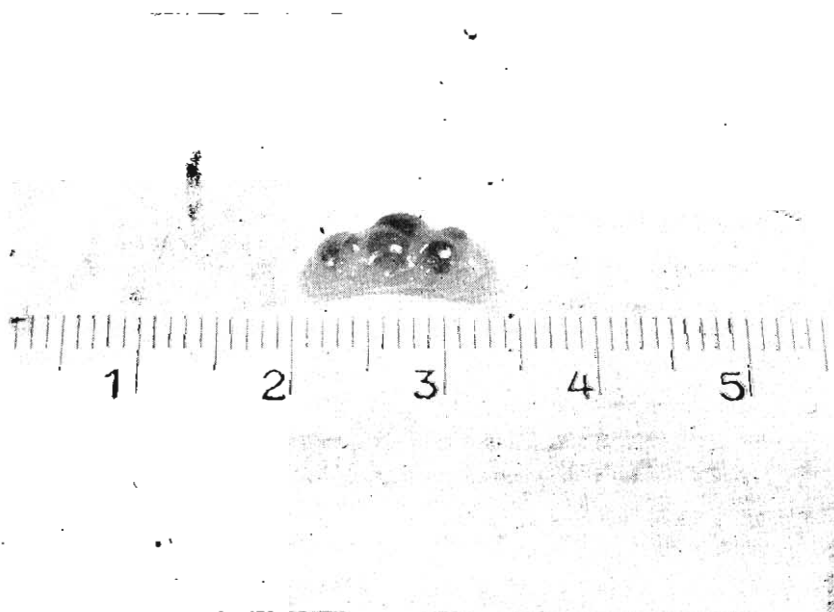
Las fotografías a continuación nos muestran el aspecto del ovario en casos de ovulación natural y de ovulación inducida :



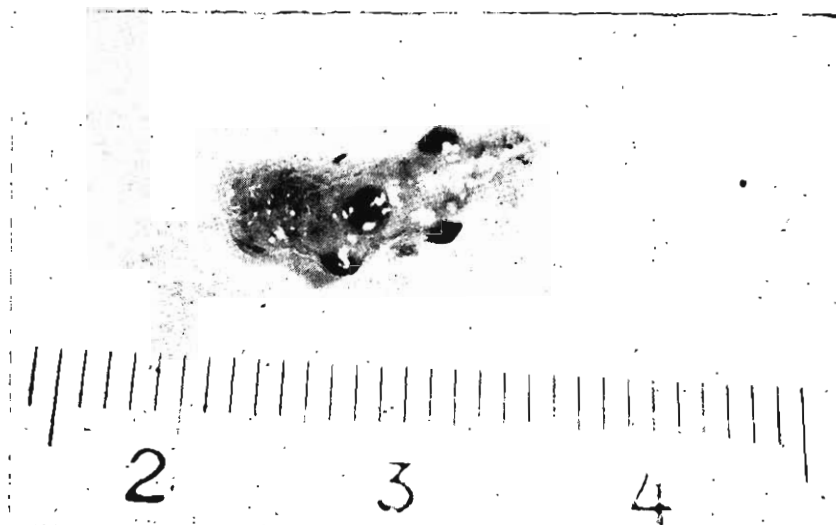
*Ovario de crecimiento folicular y ovulación natural. Se puede observar puntos de ovulación y folículos que no han ovulado.*



*Ovario de crecimiento folicular natural y ovulación inducida con 25 U.I. de Pregnyl. Se observa puntos de ovulación y folículos hemorrágicos.*



*Ovario de crecimiento folicular y ovulación inducida (60 U.I. de Gestyl y 50 U.I. de Pregnyl) mostrando un punto de ovulación, Un folículos maduro y 5 hemorrágicos.*



*Ovario de crecimiento folicular y ovulación inducida (90 U.I. de Gestyl y 50 U.I. de Pregnyl) en el que se pueden apreciar 4 puntos de ovulación, 2 folículos maduros y 5 hemorrágicos.*



## IV. TRANSPORTE DEL ESPERMATOZOIDE Y VIABILIDAD DE LOS GAMETOS

A) *Métodos.*

1. *Para el transporte de los espermatozoides.*—Hembras en celo se hicieron servir por machos, registrando el tiempo de la monta, para sacrificarlas a las 3, 4, 5 y 6 horas después. Se disecó el tracto genital, cortando en 3 segmentos tanto los cuernos uterinos como las trompas, para luego ser lavados con suero fisiológico que se recogía en porta-objetos que eran examinados al microscopio, contándose el número de espermatozoides que se encontraban en cada segmento.

2. *Para viabilidad de los gametos.*

a) Selección de los animales en celo. Las hembras se probaban con machos vasectomizados, separando para el trabajo, todas aquellas que lo aceptaban pero sin permitir que copularan.

b) Inducción de la ovulación. Se realizó permitiendo la cópula con machos vasectomizados.

c) Recolección del semen e inseminación. La recolección se hizo por medio de la vagina artificial y la inseminación se efectuó, con ayuda de pipetas, en el fondo de la vagina. Todos los sémenes empleados tenían una motilidad mínima de 60 por ciento.

d) Recuperación de los óvulos. Los animales se sacrificaron 48 horas después de la inseminación, y el tracto genital, previa disección, era lavado interiormente con suero fisiológico, recogiendo el líquido del lavado en lunas de reloj que eran examinadas al microscopio.

B) *Resultados.*

Los resultados obtenidos se pueden observar en los cuadros a continuación :

CUADRO XI  
TRANSPORTE DEL ESPERMATOZOIDE

Horas	Nº Animales	Cuernos uterinos			Trompas		
		Tercio interno	Tercio medio	Tercio externo	Tercio interno	Tercio medio	Tercio externo
3	2	+++	++-	++	+	--	-
4	2	+++	+++	+++	++	+	+
5	2	+++	++-	+++	++	+	+
6	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+ un espermatozoide  
++ de 2 a 20 espermatozoides  
+++ más de 20 espermatozoides.

Total animales = 8

CUADRO XII  
VIABILIDAD DE LOS GAMETOS

Para Espermatozoide									
Inseminación		Recuperación			Inseminación		Recuperación		
Hrs. antes de inducir ovulación	Nº Animales	Estériles	Fértiles	Fértilidad %	Hrs. después de inducir ovulación	Nº Animales	Estériles	Fértiles	Fértilidad %
4	1	0	3	100	—	—	—	—	—
5	2	0	11	100	5	8	2	36	94.7
6	1	0	7	100	6	4	1	19	95.0
7	1	0	6	100	7	8	2	38	95.0
8	1	0	7	100	8	4	3	12	80.0
9	1	0	5	100	9	3	5	11	68.6
10	1	0	5	100	10	3	6	3	33.3
11	1	0	7	100	11	3	9	5	35.7
12	1	0	4	100	12	5	15	5	25.0
13	2	3	7	70.0	13	2	8	4	33.3
14	2	5	6	54.5	14	5	18	6	25.0
15	2	5	5	50.0	15	2	10	0	0.0
16	2	7	5	41.6	16	5	26	2*	0.0
17	2	6	6	50.0	17	5	17	3*	0.0
18	3	13	0	0.0	18	3	15	0	0.0
19	1	2	0	0.0	19	1	4	0	0.0
20	2	12	0	0.0	20	4	19	0	0.0
21	1	6	0	0.0	21	—	—	—	—
22	1	8	0	0.0	22	2	3	0	0.0
23	1	3	0	0.0	23	—	—	—	—
24	2	9	0	0.0	24	—	—	—	—

\* Ovulos considerados infértiles por estar a las 48 horas en la segunda segmentación.

Total de animales = 98.

### C) Interpretación.

Si consideramos que el espermatozoide, "in vitro", puede desplazarse de 1 a 3 mm. por minuto en un medio líquido sometido a temperatura de 38° (45), las especies se dividirán en dos grupos principales, uno, constituido por aquellas en que el espermatozoide arriba al tercio externo de las trompas en tiempo menor al que es capaz de emplear por su propia motilidad y el otro, formado por las especies en que el tiempo de transporte corresponde al que el espermatozoide emplearía debido a su motilidad. La mujer con 3 horas (46); la vaca con 4.5 a 5.5 horas

(47); la perra con 2 horas (48); serían representantes del primer grupo, por el contrario, la coneja con 3 a 4 horas (49) y según nuestros resultados, de 4 a 6 horas, corresponde al segundo grupo, ya que la longitud de los cuernos uterinos y trompas es más o menos de 30 centímetros.

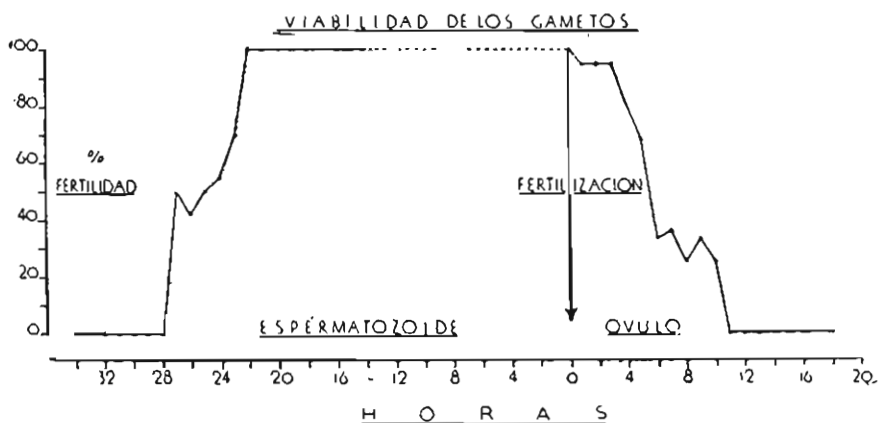
Si analizamos nuestros resultados, vemos que es sólo a las 6 horas que encontramos una concentración alta de espermatozoides en el tercio externo de la trompa y si aceptamos, que es necesaria una cierta concentración espermática para que se realice la fertilización, ya que el cúmulus oophorus que envuelve el óvulo sería un obstáculo para la penetración del espermatozoide, cúmulus, que es dispersado cuando la enzima hialurinasa aportada por el espermatozoide alcanza un cierto nivel (50, 51, 52), tendremos que reconocer que el tiempo entre la inseminación y fertilización del óvulo es más o menos de 6 horas, a pesar, de que los espermatozoides comienzan a llegar al tercio extremo de la trompa 4 horas después de la inseminación, pero sin alcanzar una concentración suficiente como para dispersar a las células del cúmulus.

Considerando que 6 horas es el tiempo mínimo entre la inseminación y fertilización, los resultados que hemos obtenido para la viabilidad de los gametos, se podrán representar gráficamente, si corregimos los resultados del cuadro XI en la forma siguiente :

1. Para la viabilidad del espermatozoide, agregando 10 horas, tiempo que transcurre entre la inducción y la ovulación.

2. Para la viabilidad del óvulo, agregando 6 horas, tiempo mínimo entre inseminación y fertilización, al tiempo que se dejó transcurrir entre la inducción de la ovulación y la inseminación y restando a esta suma, 10 horas, tiempo entre inducción y ovulación.

Electuadas estas correcciones obtenemos la gráfica siguiente :



En esta gráfica, podemos observar que el espermatozoide mantiene el 100% de su capacidad fertilizante por un período de 22 horas y brus-

camente, ésta declina para perderse por completo 6 horas más tarde. Estas observaciones, no concuerdan con las de otros autores (53) que dan, para esta especie, 32 horas como la viabilidad máxima del espermatozoide, a pesar que nosotros, para una mayor exactitud en nuestros resultados, hemos ensayado 11 conejas en las que el tiempo de permanencia del espermatozoide variaba de 28 a 34 horas y de las cuales recuperamos 53 óvulos, todos ellos sin segmentarse.

En cuanto a la viabilidad del óvulo, vemos en la gráfica, que a las 11 horas después de ovulado pierde por completo el poder de ser fertilizado y que este poder, sólo es mantenido en su máximo por un período de 3 horas, tiempo sumamente corto si lo comparamos con las 22 horas que el espermatozoide conserva el 100 por ciento de su capacidad fertilizante. Se ha pensado, que el óvulo de la coneja no tiene una viabilidad corta, sino que la capa de mucina que se deposita sobre el mismo, durante su pasaje por la trompa, sería un obstáculo mecánico para su fertilización (54), pero según nuestras observaciones (Cap. V), esta capa no se forma antes que el óvulo pierda el cúmulus oophorus, cosa que sucede entre las 16 y 18 horas después de la ovulación, en ausencia de espermatozoide y mucho más precozmente, cuando estos están presentes y por lo tanto, cuando esta capa de mucina inicia su formación, ya hace algunas horas que el óvulo ha perdido el poder de ser fecundado. Si suponemos, que la fertilización se puede realizar en el momento de la llegada de los primeros espermatozoides al tercio externo de la trompa o sea, más o menos 4 horas después de la inseminación, resultaría que sólo por un período de una hora el óvulo mantendría el máximo de viabilidad, perdiéndola por completo, 7 horas más tarde.

En cualquiera de estas dos posibilidades, fertilización inmediata a la llegada de los primeros espermatozoides al tercio externo de la trompa o siguiendo a un período en que estos alcanzan una concentración como para dispersar las células del cúmulus oophorus, el óvulo tiene una viabilidad muy corta y es la última posibilidad la que existe en condiciones naturales, ya que la ovulación se produce más o menos 10 horas después de la cópula y por lo tanto los espermatozoides tienen tiempo más que suficiente para concentrarse en el tercio externo de la trompa y se pueda realizar la fertilización.

Un hecho importante que se desprende de nuestras observaciones y que se observa claramente en la gráfica, es que para obtener 100% de fertilización, el espermatozoide debe esperar al óvulo, período de espera, que se puede iniciar desde 22 horas antes que la ovulación se presente, en cambio, el óvulo en períodos de espera, tan cortos como una hora, ya muestra una viabilidad ligeramente disminuída, fenómeno, que se hace mucho más manifiesto, cuando ese período se prolonga sobre las tres horas.

V. EFECTOS DE LAS HORMONAS OVÁRICAS SOBRE EL DESARROLLO  
EMBRIOLÓGICO PRECOZ

A) *Métodos.*

1. *Animales controles.*—Conejas sexualmente maduras eran probadas, en las primeras horas de la mañana, con machos vasectomizados dejando que éste sirviera a las que estaban en estrous. Pasadas 4 horas de inducida la ovulación, se inseminaban artificialmente con sémenes recogidos por medio de la vagina artificial. Una parte de los animales se sacrificó, más o menos 24 horas después de inducir la ovulación y el resto, a las 48 horas.

2. *Tratamiento hormonal.*—Conejas en estrous, que habían sido tomadas por machos vasectomizados, inmediatamente después fueron inyectadas subcutáneamente con las hormonas en estudio. Este tratamiento hormonal se repitió cada 12 horas, de manera que los animales que se sacrificaron a las 24 horas recibían 2 inyecciones y 4, los de 48 horas. La inseminación se realizó como en los animales controles.

3. *Sémenes e inseminación.*—Todos los sémenes fueron recolectados por vagina artificial y examinados al microscopio, para utilizar solo aquellos que tenían una motilidad mínima de 60%. El volumen empleado por inseminación fué de un minimum de 0.5 cc. de semen puro por animal, colocándolo con ayuda de pipetas, en el fondo de la vagina.

4. *Recuperación de los óvulos y huevos.*—Las trompas y tercio externo de los cuernos uterinos se lavaban con suero fisiológico, examinando el líquido del lavado al microscopio estereoscópico. Los óvulos y huevos se recogían con micropipetas, bajo el microscopio estereoscópico, para ser colocados en porta-objetos que eran examinados y fotografiados a un mayor aumento.

B) *Resultados.*

Los resultados obtenidos se pueden apreciar en los cuadros siguientes :

## CUADRO XIII

OVULOS DE 11.45 A 13 HORAS DE EDAD

Marca Conejas	Hormona	Dosis total Inyectada	Edad óvulos	Resultados
C—1	————	————	13.00 horas	5 con cúmulos oophorus que inicia su desintegración. 1 con restos de cúmulus.
C—2	————	————	12.25 horas	5 con cúmulos oophorus que inicia su desintegración.
C—3	————	————	12.00 horas	4 con cúmulus oophorus que inicia su desintegración. 3 con restos de cúmulus.
C—4	Estradiol	8 mgrs.	12.00 horas	3 con algunas células de la corona radiata. 2 con zona pelucida limpia. Inicio de capa de mucina.
C—5	Estradiol	8 mgrs.	11.45 horas	4 con algunas células de la corona radiata. Inicio de capa de mucina.
C—6	Estrona	8 mgrs.	13.00 horas	2 con restos de cúmulus oophorus. 1 con algunas células de la corona radiata.
C—7	Estrona	8 mgrs.	12.00 horas	3 con restos de cúmulus oophorus. 2 con células de corona radiata. 1 con zona pelucida limpia. Inicio de capa de mucina.
C—8	Proges- terona	50 mgrs.	12.00 horas	1 con cúmulus oophorus que inicia su desintegración. 2 con restos de cúmulus. 1 con corona radiata. 1 con algunas células de la corona radiata. No hay capa de mucina.
C—9	Proges- rona	50 mgrs.	12.30 horas	4 con restos de cúmulus. 2 con corona radiata. No hay capa de mucina.
C-10 al C-12	Inseminación		13.00 horas	28 huevos, unos en dos blastómeros y otros iniciando la segunda segmentación. Inicio de capa de mucina.

## CUADRO XIV

DESARROLLO NATURAL HUEVOS DE 36.5 A 38 HORAS DE EDAD

Nº coneja	Edad del huevo	R e s u l t a d o
I	37 horas	6 de 16 células.
II	36.5 „	5 de más 16 células.
III	37 „	6 de más 16 células.
IV	38 „	4 de más 16 células.
V	37 „	2 de 8-16 células y 7 de 16 células.
VI	36.5 „	7 de 16 células.
En todos se encuentran la capa de mucina.		
T O T A L E S		De 8-16 células ... .. 2
		De 16 células ... .. 20
		De más 16 células ... .. 15

## CUADRO XV

HUEVOS DE 36 A 38 HORAS DE EDAD  
TRATAMIENTO CON ALFA-ESTRADIOL

TRATAMIENTO				
Nº Coneja	Hormona	Dosis total inyectada	Edad del huevo	R e s u l t a d o
I	Alfa-estradiol	5.6 mgrs.	36.5 horas	5 de 8 células. Capa alb. reducida.
II	„	„ „	38 horas	3 sin segmentar; 2 fragmentación polar y 2 de 8-16 células. Capa alb. reduc.
III	„	„ „	38 horas	3 de 4-8 células y 4 de 8-16 células. Capa alb. reduc.
IV	„	11.2 mgrs.	37.5 horas	3 de 8-16 células y 2 de 16 células. Capa alb. reduc.
V	„	„ „	36 horas	3 sin segmentos. Capa alb. reducida.
VI	„	„ „	36.5 horas	1 de 5 células; 2 de 4-8 células y 2 de 8-16 células. Capa alb. reducida.
VII	„	14.0 mgrs.	38 horas	3 de 8 células y 4 de 8-16 células. Capa alb. reduc.
VIII	„	„ „	37.5 horas	2 de 8-16 células y 3 de 16 células. Capa alb. reduc.
				Sin segmentar ... .. 6
				Con fragmentación polar ... .. 2
T O T A L E S				De 5 células ... .. 1
				De 4-8 células ... .. 5
				De 8 células ... .. 8
				De 8-16 células ... .. 17
				De 16 células ... .. 5

## CUADRO XVI

HUEVOS DE 36 A 38 HORAS DE EDAD  
TRATAMIENTO CON ESTRONA

TRATAMIENTO				
Nº Coneja	Hormona	Dosis total inyectada	Edad del huevo	Resultado
I	Estrona	8.0 mgrs.	37 horas	1 de 8-16 células y 5 de 16 células. Capa alb. reducida.
II	"	" "	37 horas	1 de 8-16 células y 5 de 16 células. Capa alb. reducida.
III	"	" "	37 horas	3 de 8-16 células y 3 de 16 células. Capa alb. reducida.
IV	"	" "	37.5 horas	6 de 16 células. Capa alb. reducida.
V	"	" "	36.5 horas	1 de 8 células y 7 de 8-16 células. Capa alb. reducida.
VI	"	16.0 mgrs.	36 horas	2 sin segmentar y 4 de 16 células. Capa alb. reducida.
VII	"	" "	36.5 horas	1 de 4-8 células; 1 de 8 células y 6 de 8-16 células. Capa alb. reducida.
VIII	"	" "	37 horas	5 de 8-16 células y 1 de 16 células. Capa alb. reducida.
IX	"	" "	38 horas	2 con degeneración y 4 de 16 células. Capa alb. reducida.
X	"	" "	37.5 horas	1 de 8-16 células y 4 de 16 células. Capa alb. reducida.
T O T A L E S				Degenerados . . . . . 2
				Sin segmentar . . . . . 2
				De 4-8 células . . . . . 1
				De 8 células . . . . . 2
				De 8-16 células . . . . . 24
				De 16 células . . . . . 32



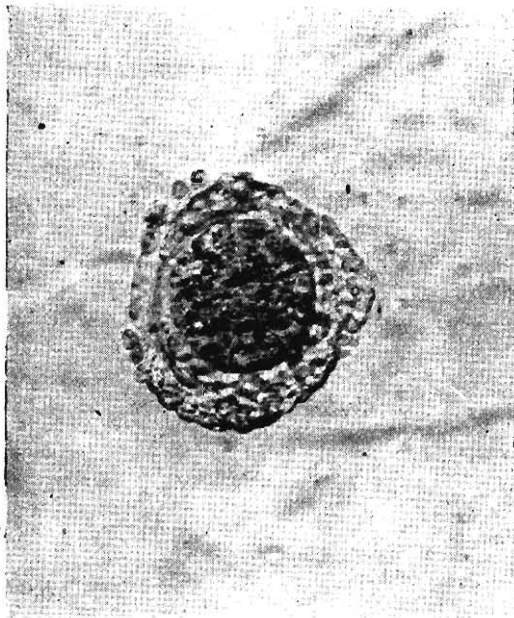
## CUADRO XVII

HUEVOS DE 35 A 38 HORAS DE EDAD  
TRATAMIENTO CON PROGESTERONA

TRATAMIENTO				
Nº Coneja	Hormona	Dosis total inyectada	Edad del huevo	Resultado
I	Progesterona	5 mgrs.	35 horas	6 de 16 células. Capa alb. normal.
II	"	" "	38 horas	4 de más 16 células. Capa alb. normal.
III	"	10 mgrs.	37 horas	3 de 16 células. Capa alb. normal.
IV	"	" "	37 horas	1 de 8-16 células y 4 de 16 células. Capa alb. normal.
V	"	15 mgrs.	38 horas	4 de 16 células. Capa alb. normal.
VI	"	20 mgrs.	36 horas	4 de 8-16 células y 2 de 16 células. Capa alb. aumentada.
VII	"	" "	36 horas	6 de 16 células. Capa alb. aumentada.
VIII	"	25 mgrs.	37 horas	2 de 8-16 células y 4 de 16 células. Capa alb. aumentada.
IX	"	" "	36.5 horas	1 de 8-16 células y 3 de 16 células. Capa alb. aumentada.
X	"	" "	37 horas	6 de 16 o más células. Capa alb. aumentada.
XI	"	" "	35.5 horas	5 de 8-16 células y 2 de 16 células. Capa alb. aumentada.
XII	"	40 mgrs.	36.5 horas	1 de 8-16 células. Capa alb. aumentada.
XIII	"	" "	37 horas	6 de 16 células. Capa alb. aumentada.
XIV	"	50 mgrs.	37 horas	7 de 16 o más células. Capa alb. aumentada.
T O T A L E S				Huevos de 8-16 células 14
				Huevos de 16 células ... 44
				Huevos más 16 células 17

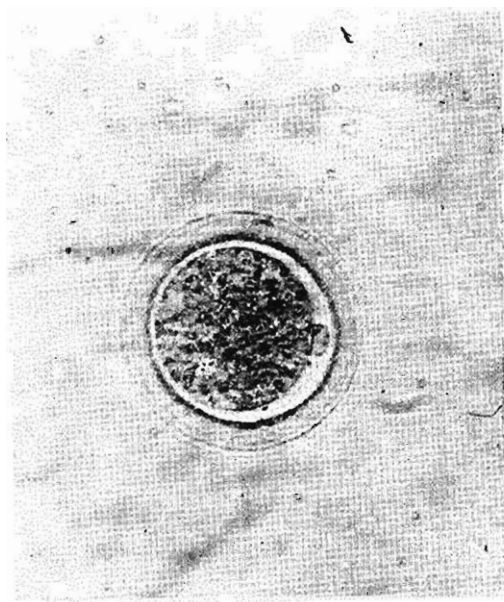
## C) Interpretación.

1. *Ovulos de 11.45 a 13.00 horas de edad.*—Los óvulos de esta edad, provenientes de conejas a las que se ha inducido ovulación con servicio estéril, muestran el cúmulus oophrorus que comienza a desintegrarse, llegando en muy pocos casos a un desprendimiento parcial de este cúmulus. En ningún caso se encuentra indicios de formación de la capa de mucina que a más edad envolverá al óvulo. (Microfotografía I).

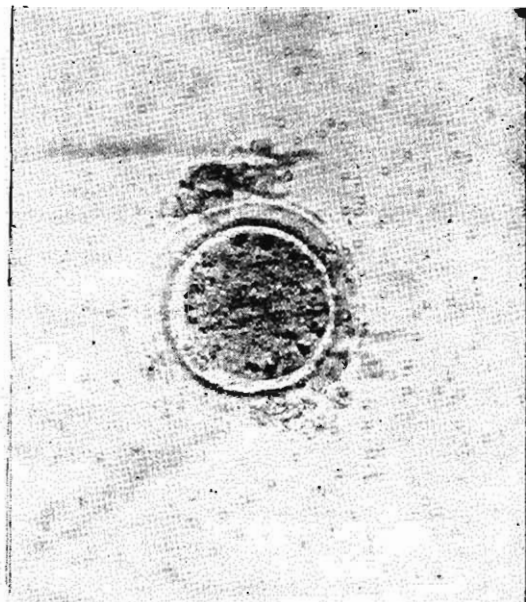


1.—*Ovulo estéril de 13.00 horas.*  
(420x)

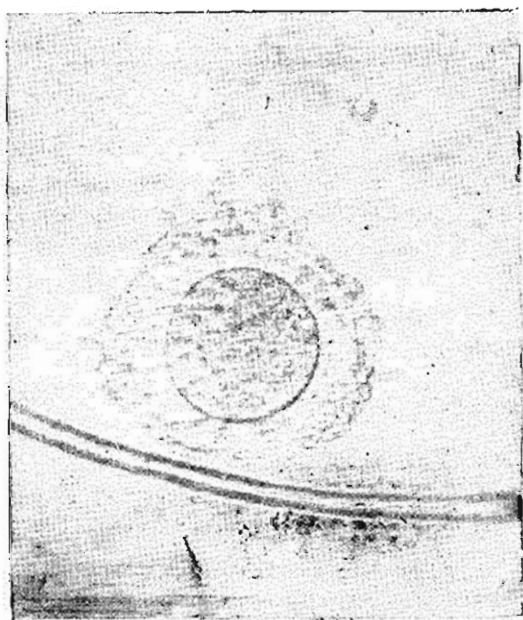
Cuando los animales son tratados con hormonas ováricas, se observa en el caso del estradiol, que el óvulo no posee ni el cúmulus oophrorus, ni la corona radiata, encontrándose en algunos casos unas cuantas células foliculares adheridas a la zona pelúcida que ya está cubierta por una capa delgada de mucina. Un efecto semejante, pero mucho menos acentuado, se obtiene al emplear estrona y prácticamente ninguno o muy atenuado, en el caso de administrar progesterona a dosis mucho mayores que los productos estrógenos. (Microfotografías II al IV).



II.—*Tratamiento con estradiol*  
(420x)

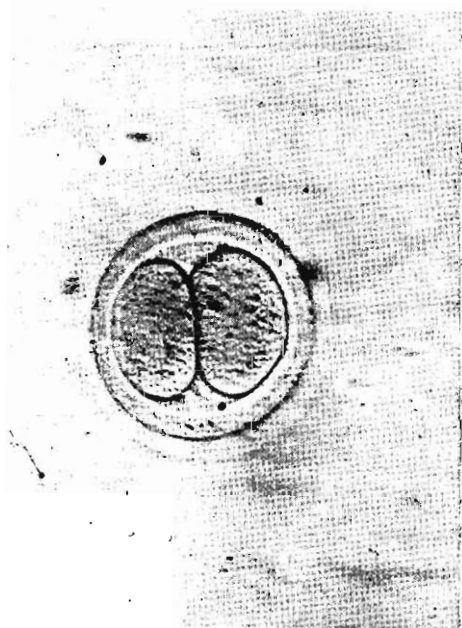


III.—*Tratamiento con estrona*  
(420x)

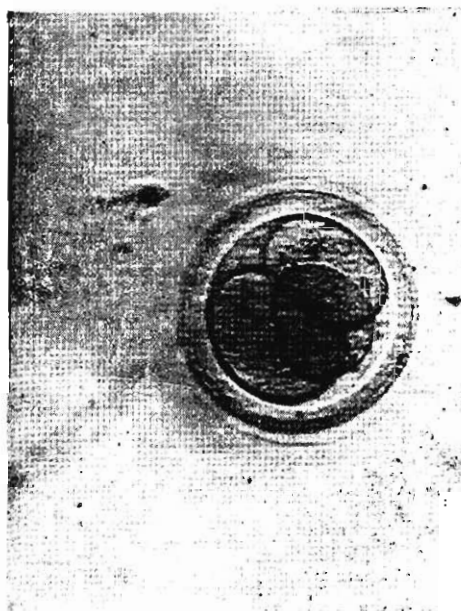


IV.—*Tratamiento con progesterona*  
(420x)

Los huevos de la misma edad se encuentran en el estado de 2 blastómeros o iniciando la segunda división de segmentación y por lo general, muestran una zona pelúcida libre de células foliculares y cubiertas por mucina. (Microfotografías V y VI).



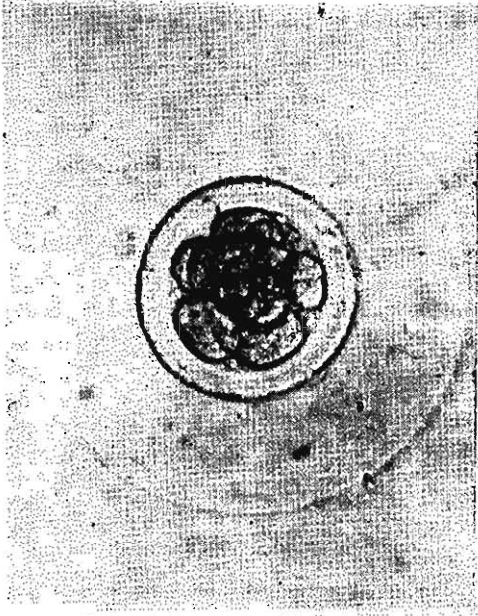
V.—Huevo de 13.00 horas al final de la I segmentación  
(420x)



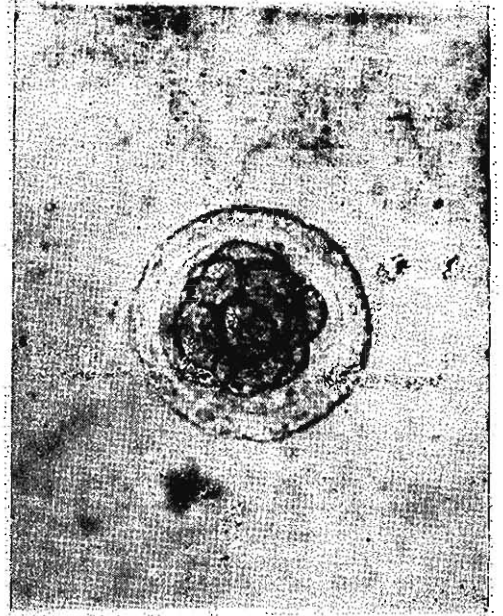
IV.—Huevo de 13.00 horas iniciando la II segmentación  
(420x)

Ha sido demostrado que los espermatozoides aceleran el proceso natural de desintegración del cúmulus oophorus por la acción de la enzima hialurinasas (50 al 52) y en nuestros ensayos encontramos que entre las hormonas ováricas, el estradiol, y en segundo lugar, la estrona, pueden ya sea directa o indirectamente dispersar a las células del cúmulus oophorus, lo cual nos hace pensar que posiblemente los productos estrogénicos podrían participar en la desintegración de este cúmulus en los óvulos que no han sido fertilizados.

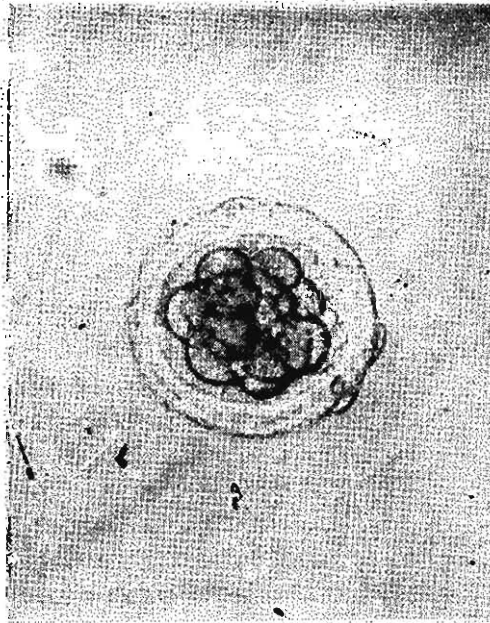
2. Huevos de 35 a 38 horas de edad.—Los huevos de los animales controles a esta edad, se presentan, por lo general, en el estado de 16 células o algo más pero sin llegar a completar la 5 división de segmentación. La zona pelúcida se muestra limpia o con algunas células foliculares y cubierta por una gruesa capa de mucina. (Microfotografías VII al IX).



VII.—Huevo de 36.50 horas.  
(420x)

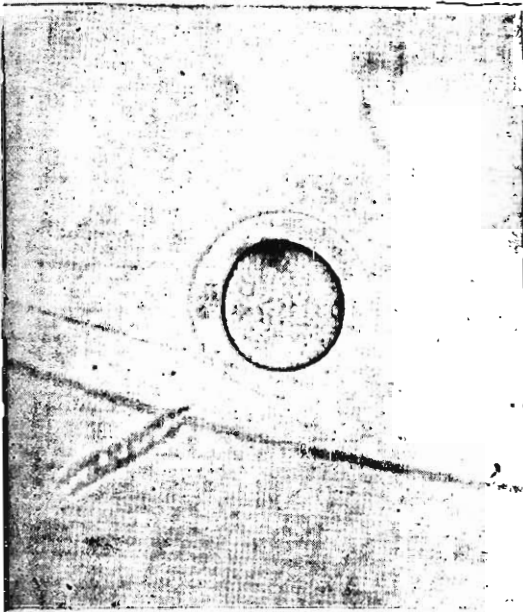


VIII.—Huevo de 37.00 horas  
(420x)

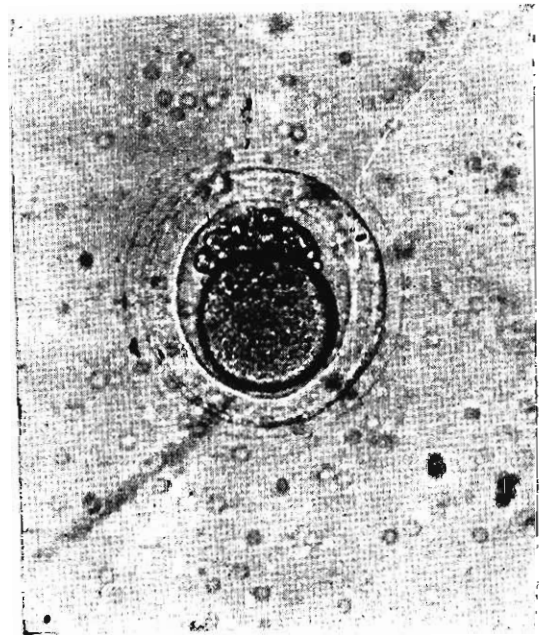


IX.—Huevo de 38.00 horas  
(420x)

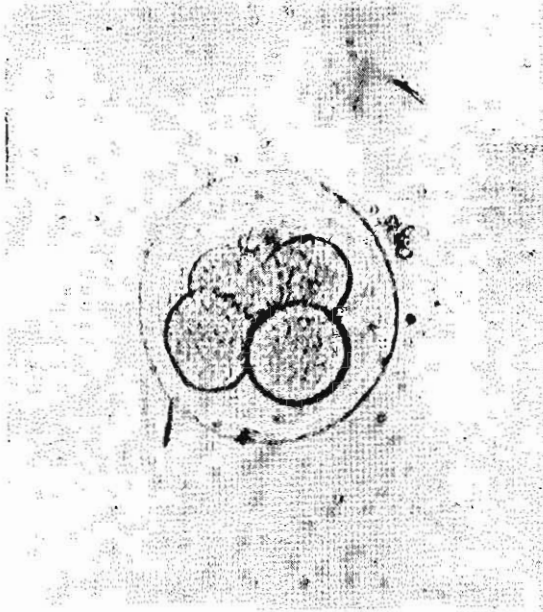
En cuanto a los huevos de animales que han sido sujetos a tratamiento con hormonas ováricas dan imágenes muy significativas. Cuando se administra estradiol, no solo se encuentra una cierta tendencia a frenar la frecuencia de segmentación, sino que también existe un porcentaje relativamente alto de huevos sin segmentar, a pesar que muestran una gran cantidad de espermatozoides adheridos a su superficie. Por último, se encuentra una capa de mucina muy reducida. (Microfotografías X al XVI).



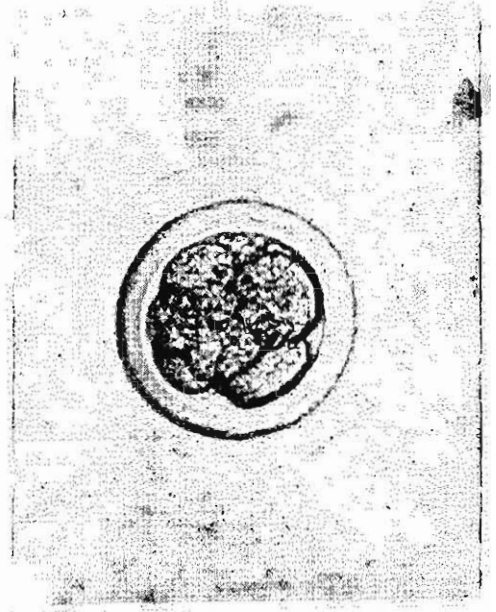
*X.—Huevo de 36.00 horas sin  
segmentarse  
(420x)*



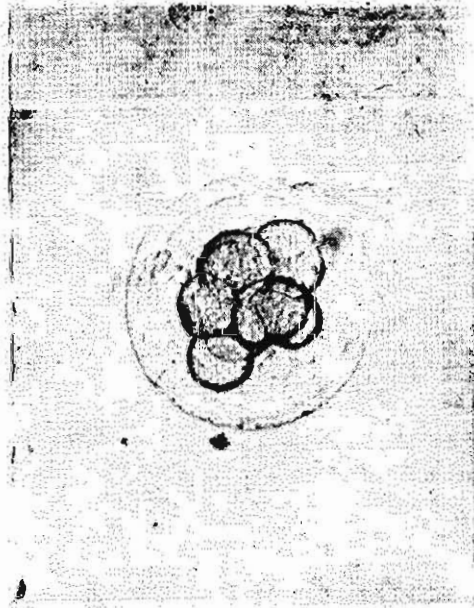
*XI.—Huevo de 38.00 horas mostrando  
segmentación polar.  
(420x)*



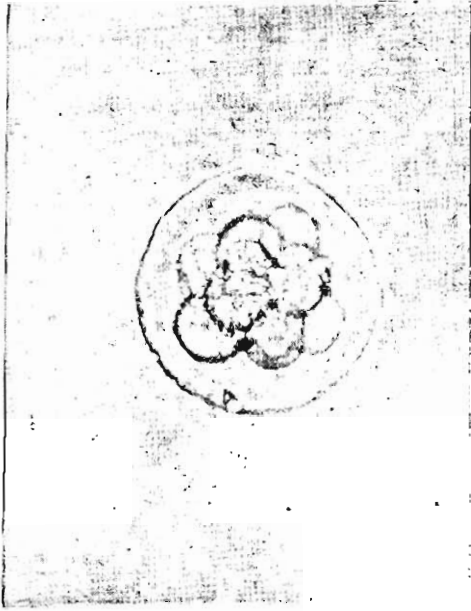
XII.—Huevo de 36.50 horas formado por 5 blastómetros.  
(420x)



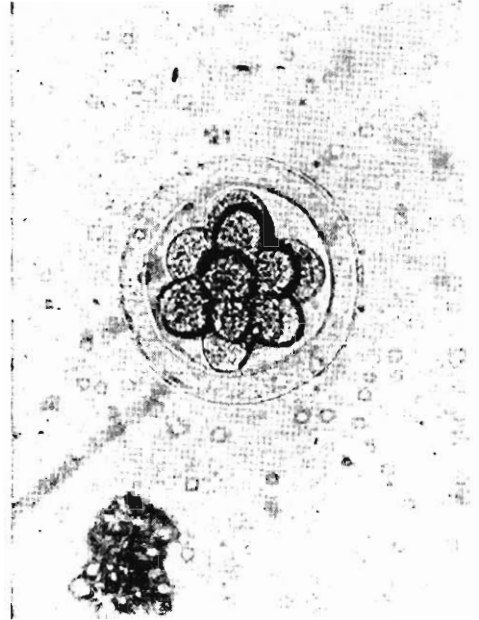
XIII.—Huevo de 36.50 horas en la III segmentación.  
(420x)



XIV.—Huevo de 38.00 horas después de la III segmentación.  
(420x)



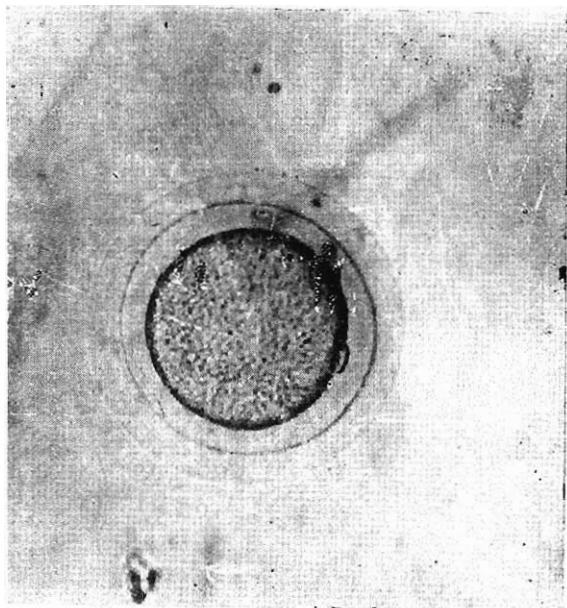
XV.—Huevo de 33.50 horas en la IV  
segmentación.  
(420x)



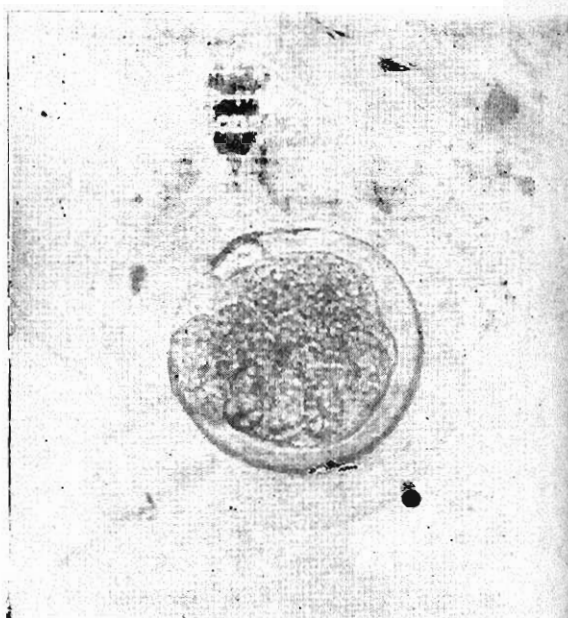
XVI.—Huevo de 37.50 horas en el  
estado de 16 células.  
(420x)

En el caso de la administración de estrona, los efectos son similares a los obtenidos con estradiol, pero mucho menos acentuados. Hay segmentación retardada, comparándolos con los controles, pero en intensidad menor que con estradiol, notándose el mismo efecto, pero atenuado, en relación a la capa de mucina. (Microfotografías XVII al XXII).

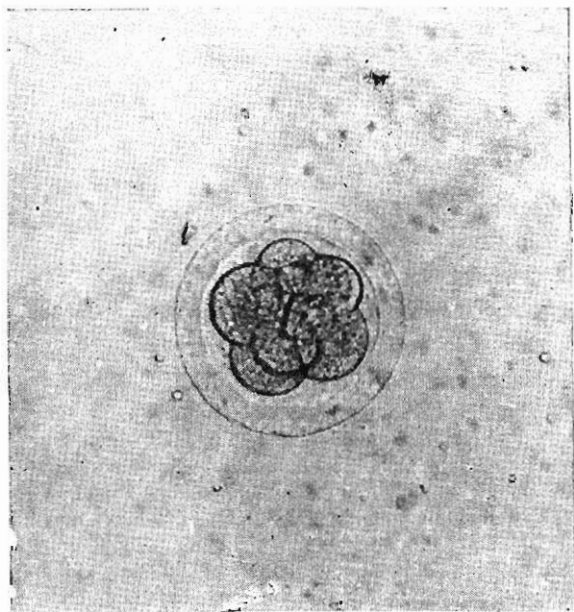




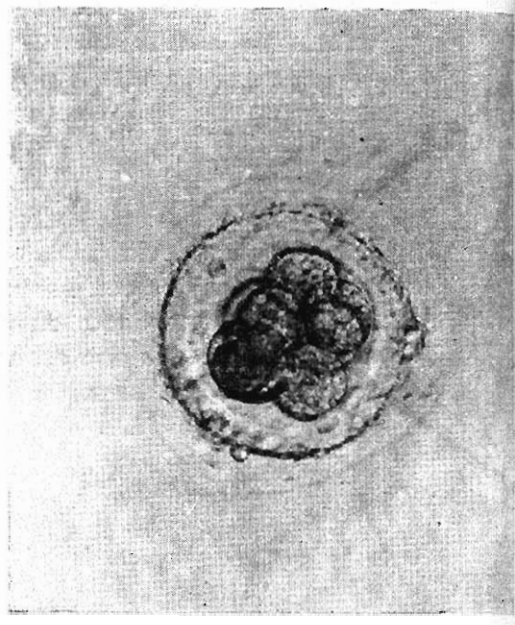
XVII.—Huevo de 36.00 horas sin  
segmentar.  
(420x)



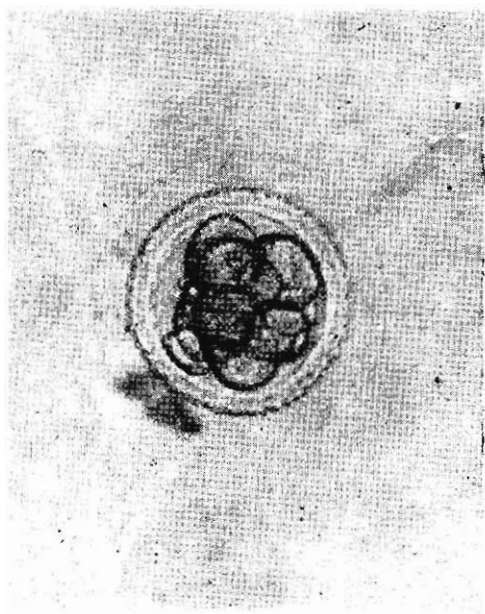
XVIII.—Huevo de 38.00 horas mostran-  
do signos degenerativos.  
(420x)



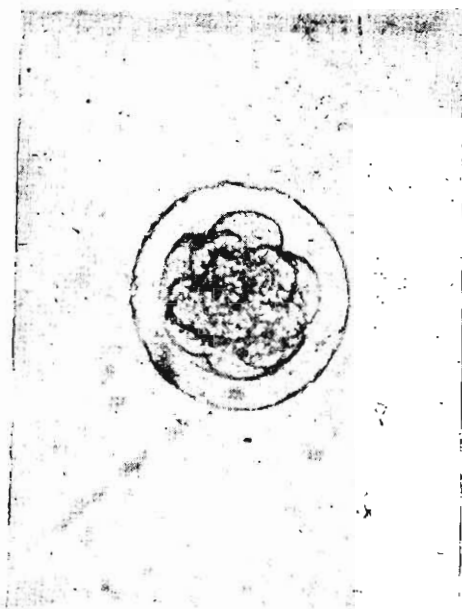
XIX.—Huevo de 36.50 horas en la III  
segmentación.  
(420x)



XX.—Huevo de 36.50 horas en periodo  
de 8 células.  
(420x)

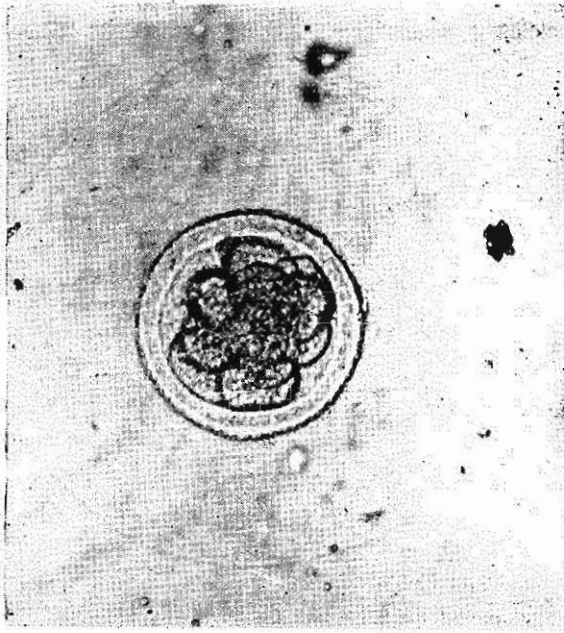


XXI.—Huevo de 37.50 horas en la IV  
segmentación.  
(420x)

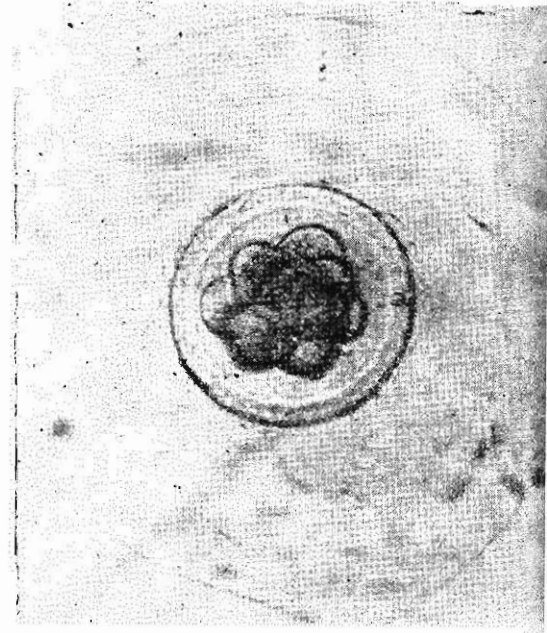


XXII.—Huevo de 37.00 horas en el  
período de 16 células.  
(420x)

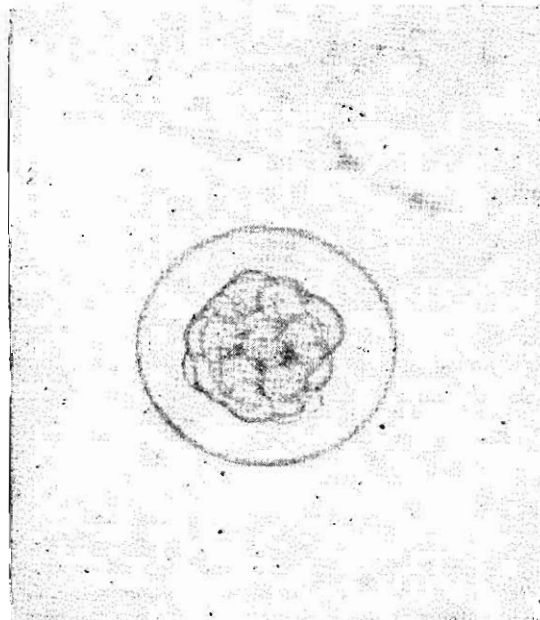
Cuando los animales son tratados con progesterona, prácticamente no se observa ningún efecto sobre la segmentación del huevo y en cuanto a la capa de mucina, las dosis altas actúan sobre ella aumentándola, prácticamente en relación con la cantidad administrada. (Microfotografías XXIII al XXV.)



XXIII.—Huevo de 38.00 horas en  
período de 16 células.  
(420x)



XXIV.—Huevo de 36.50 horas en la IV  
segmentación.  
(420x)



XXV.—Huevo de 37.00 horas consti-  
tuido por más de 16 células.  
FACULTAD DE MEDICINA

Expresando en porcentajes los resultados obtenidos para los animales controles y los tratados con los diferentes productos ováricos, tenemos :

## H U E V O S

Tratamiento	Sin Segmentar	Degenerados	4-8 Células	8 Células	8-16 Células	16 Células	Más de 16 Células
Controles	—	—	—	—	5.40%	54.05%	40.50%
Estradiol	13.95%	—	13.95%	18.60%	39.53%	13.95%	—
Estrona	3.17%	3.17%	1.58%	3.17%	38.09%	50.80%	—
Progesterona	—	—	—	—	18.66%	58.66%	22.66%

En este cuadro, se puede ver que el estradiol tiene un efecto inhibitorio sobre la segmentación del huevo, efecto, que es menos marcado al emplear estrona y prácticamente nulo, en el caso de la progesterona. Sin embargo, hay autores (57) que no encuentran ninguna acción al emplear oestrin y concluyen, que el proceso de segmentación sería independiente de la actividad secretoria del ovario. Posiblemente, una de las causas en estas diferencias, es la forma como se hizo el tratamiento, ya que en el último caso se trató a los animales antes o después que se produjera la ovulación y en cambio nosotros, lo iniciamos antes y la continuamos hasta 48 horas después de inducirla. Otros autores (58, 59, 61 al 63) por el contrario encuentran, al pretender transplantar en conejas, huevos de 24 horas de edad, que las trompas en estrous no son beneficiosas, siendo necesario tratar con progesterona a la hembra receptora para que los huevos transplantados puedan tener una evolución normal y al trabajar con conejas castradas después de la ovulación, demuestran que 48 horas después de la cópula, es necesario un efecto sinérgico de la progesterona y foliculina para que se realice la implantación, existiendo una relación diferente, en la que predomina la progesterona, para que se mantenga la gestación y demuestran también, que ovejas tratadas con progesterona, los catorce días anteriores a la ovulación, dan un número de crías igual a los animales controles, en cambio, en conejas en las que se había inducido superovulación se encuentra que hay una gran mortalidad embrionaria mientras no se extirpe uno de los ovarios. Junto con estos trabajos, también se encuentran otros (18, 23, 40, 60 y 64) en los que al inducir ovulación, en diferentes momentos del ciclo sexual, se demuestra que en la fase proliferativa hay fertilización y segmentación del óvulo, cosa que no sucedería en la fase secretoria, resultados, que los

confirman al no conseguir fertilización en conejas tratadas con progesterona durante períodos de 5 y 10 días antes de inducir la ovulación.

Al analizar estos trabajos, hasta cierto punto contradictorios, se ve que hay dos grupos principales, uno formado por los realizados con animales de crecimiento folicular y de ovulación natural o huevos que resultan de crecimiento inducido y son transplantados a otras hembras de ciclos naturales y el segundo grupo, constituido por ensayos sobre crecimiento folicular y ovulación inducida, intentando la fertilización y desarrollo embriológico en el mismo animal de experiencia.

Los trabajos del primer grupo (58, 59, 61, 62, 63), en los que incluimos los nuestros, nos muestran que los productos estrogénicos tienen efectos nocivos sobre el huevo, efectos, cuya naturaleza íntima no se conoce y que muy bien puede ser consecuencia de una acción hormonal directa o indirecta a través de acciones sobre las trompas. En cambio la progesterona, según estos mismos trabajos, sería necesaria en el desarrollo embriológico del huevo.

En el segundo grupo (18, 23, 24, 60, 64), encuentran que en los animales en los que se induce crecimiento folicular y ovulación, existiría fertilización y segmentación del huevo en la fase proliferativa del ciclo sexual, reacción, que va disminuyendo en la fase secretoria en función de los días de actividad del cuerpo amarillo, haciéndose completamente negativa entre los 5 y 10 días después de iniciada la fase secretoria.

Estos diversos resultados, junto con los que hemos obtenido, nos sugieren un mecanismo complejo en la fertilización y desarrollo embriológico precoz del huevo. Los productos estrogénicos, al tener una acción dispersante sobre las células del cúmulo oophorus, favorecían la fertilización, en cambio, la progesterona, de acción prácticamente nula sobre el cúmulo oophorus, tendría una acción antagónica a los estrógenos en este proceso. Este hecho, se confirma al no conseguir fertilización de los óvulos obtenidos por ovulaciones inducidas en períodos avanzados de pseudopreñez, en los que el animal está por un tiempo prolongado bajo el estímulo hormonal de la progesterona, en presencia de niveles bajos de estrógenos, hecho, que resalta aún más por las experiencias (64) que demuestran que la fertilización, se recupera en algo, cuando animales con ovulación inducida, en fase secretoria, son tratados con estrógenos. En cambio, cuando la ovulación se induce en la fase proliferativa, no se encuentra que la fertilización y segmentación del huevo estén afectados, pero hay que pensar, que en estos casos, después de inducir la ovulación, por más precoz que ésta se realice dentro de la fase proliferativa, termina con ella, pues se inicia la forma-

ción de cuerpos amarillos en los folículos que han ovulado. Estos resultados, junto con los que hemos obtenido, nos hacen pensar que una vez realizada la fertilización, sería necesario para una segmentación normal, una caída de los productos estrogénicos que se acompañe con un alza de la progesterona, cuadro, que estaría en relación con el proceso natural, en donde la fertilización se realiza cuando existen cifras altas de estrógenos, correspondiendo la segmentación, al inicio de la actividad secretoria del cuerpo amarillo y caída de los niveles estrogénicos.

## CONCLUSIONES

1ª El crecimiento folicular puede ser inducido, mediante gonadotropinas coriónicas de origen equino, en cualquier momento del ciclo sexual, existiendo una disminución de la respuesta ovárica cuando el estímulo gonadotrópico se realiza al final de la fase proliferativa, disminución que se acentúa aún más en la fase secretoria.

2ª En conejas, el promedio de folículos de crecimiento natural es de 8.65 por animal.

3ª En conejas adultas en anestrous, existe una relación directa entre la cantidad de Gestyl, gonadotropina coriónica equina, inyectada y el crecimiento folicular, siendo el coeficiente de regresión 0.273 folículos por unidad de Gestyl.

4ª Las diferencias de crecimiento folicular, natural e inducido, entre los dos ovarios estadísticamente se pueden presentar al azar dentro de una población.

5ª La ovulación, se puede producir por medio de gonadotropinas coriónicas de origen humano, tanto en folículos de crecimiento natural, como inducido. En el último caso, hay mayor sensibilidad ovárica en los animales con crecimiento folicular inducido en período de anestrous, que en estrous y en fase secretoria.

6ª El promedio de folículos que ovulan, en condiciones naturales, es de 6.20 por animal, siendo 5 U.I. de Pregnyl, gonadotropina coriónica de origen humano, una dosis capaz de inducir ovulación en conejas con crecimiento folicular natural.

7ª Las diferencias de ovulación entre los dos ovarios, estadísticamente son variaciones que se pueden producir al azar dentro de una población.

8ª Al inducir ovulación de folículos de crecimiento inducido, en conejas adultas en anestrous, se necesita una cierta relación entre las gonadotropinas coriónicas equinas que se administraron para inducir el crecimiento folicular y las gonadotropinas coriónicas humanas que se emplean para producir la ovulación, siendo los folículos hemorrágicos consecuencia de una dosis insuficiente de las últimas.

9ª El transporte de los espermatozoides desde el fondo vaginal al tercio externo de la trompa, en las conejas, toma un período de 4 a 6 horas.

10ª El espermatozoide de conejo mantiene, dentro del aparato reproductor de la hembra, el máximo de su capacidad fertilizante por

un período de 22 horas, perdiéndola por completo a las 28 horas.

11ª El óvulo mantiene el máximo de viabilidad solo por un período de 3 horas y la pierde por completo 11 horas después de la ovulación.

12ª Entre las hormonas ováricas, el estradiol y en menos intensidad la estrona, poseen efectos dispersantes sobre las células del cúmulus oophorus.

13ª La capa de albúmina, que se deposita sobre los óvulos después de que éstos tienen un cierto número de horas en las trompas, no inicia su formación sino después que el cúmulus oophorus ha sido dispersado.

14ª Los productos estrogénicos disminuyen la cantidad de albúmina que se deposita sobre los óvulos, en cambio, la progesterona la aumenta.

15ª Los productos estrogénicos, en especial el estradiol y en menos intensidad la estrona, poseen una acción inhibitoria sobre la segmentación del huevo, acción que no posee la progesterona.

---



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

- 1.—HILL M. y WHITE W.E. J. *Physiol.* 80: 174-178, 1934.
- 2.—ANCEL P. y BOVIN P. *Compt. Rend. Soc. Biol., Paris*, 67: 497-498, 1939.
- 3.—HAMMOND J. y MARSHALL F.H.A. **Reproduction in the Rabbit**. Edinburgh, 1925.
- 4.—HISAW F. *Physiological Review*, 27: 95-119, 1947.
- 5.—CHOH HAO L. **Vitamins and Hormones**. Vol. VII. Academic Press Publishers. N. Y., 1945.
- 6.—SMITH P.H. **Sex and Internal Secretions**. Chap. XVI. 2nd. E. Williams & Wilkins, 1939.
- 7.—SOMERS H.S. *Fet. and Steril.* 1: 40-52, 1950.
- 8.—HARTMAN C.G. **Sex and Internal Secretions**. Chap. IX 2nd. E. Williams Wilkins, 1939.
- 9.—DAWSON A.B. *Anat. Rev.* 79: 155, 1941.
- 10.—ASDELL S.A. y HAMMOND J. *Am. J. Physiol.* 103: 600-605, 1933.
- 11.—LANE C.E. *Am. J. Physiol.* 110: 681, 1935.
- 12.—PFEIFFER. *Am. Rev. Physiol.* 413, 1943.
- 13.—CASIDA L.E., MEYER R.K., MCSHAN W.H. y WISNICKY. *J. Vet. Res.* 4: 76-94, 1943.
- 14.—FRANK A.H., SCHOTT R.G. y SIMMONS V.L. *J. Ani. Sc.* 4: 317-324, 1945.
- 15.—COLE H.H., PENCHARZ R.I., Goss, H. *Endocrinology* 27: 548-553, 1940.
- 16.—HAMMOND J., HAMMOND J. Jr. y PARKES A.S. *J. Arg. Sc.* 32: 30, 1942.
- 17.—SNEDECOR G.W. **Statistical Methods**. Cap. IV The Iowa State College Press, 1946.
- 18.—TANABE I.Y., WARNICK A.C., CASIDA L.E. y GRUMMER R. *J. Animal Sc.* 8: 550-577, 1949.
- 19.—CASIDA L.E. *Endocrinology* 18: 714-720, 1934.
- 20.—CASIDA L.E., NALBANDOV, MCSHAN W.H., MEYER R.K. *Proc. Am. Soc. Ani. Proc.* 302-304, 1940.
- 21.—id., id. *Proc. Am. Soc. Ant. Proc.* 144-145, 1934.
- 22.—id., id. *Anat. Rc.* 61: 389-396, 1935.
- 23.—id., id. MEYER R.K., MCSHAN W.H., WISNICKY W. *J. Vet. Res.* 4: 76-94, 1943.
- 24.—MURPHREE R.L., WARWICH E.J., CASIDA L.E., MCSHAN W.H. *J. Ani Sci* 3: 12-21, 1944.
- 25.—HAMMOND J. Jr. y BHETTACHARYA P. *J. Agri. Sc.* 34: part I, 1943.
- 26.—COLE H.H., HART G.H. y MILLER R.F. *Endocrinology.* 36: 374, 1945.
- 27.—SNEDECOR G.W. **Statistical Methods**. Cap. X. The Iowa State College Press, 1946.
- 28.—DOWLING D.F. *J. Agric. Sc.* 39: 374-396, 1949.
- 29.—PINCUS G. *Anat. Rec.* 77: 1, 1940.
- 30.—THABOULT CH., ORTAVANT R., LAPLAND M. *Ann. End. Fr.* 9: 83-89, 1948.
- 31.—HAMMOND J. JR. *J. Agric. Sci.* 39: 212-225, 1949.

- 32.—id. id. J. Minist. Agric. 57: 67-70, 1950.
- 33.—HARTMAN C. *Essays in Biology*, Pag. 229-234. University Calif. Press, 1943.
- 34.—ROWSON L.H. J. End. 7: 260-270. 1951.
- 35.—FOLLEY S.J., GREENBAUM A.L. y ROY A. J. End. 4: 121-131, 1945.
- 36.—Umbaugh R.E. Am. J. Vet. Res. 10: 295-305, 1949.
- 37.—ORTAVANT R., THIBAUT CH. y Wilenberger P. An. d'End. 10: 170-173, 1949.
- 39.—id., id. J. Endocrinology, 4: 127, 1945.
- 40.—id., id., id., id., 4: 13, 1945.
- 41.—ZONDEX D. **Las Hormonas del ovario y del lóbulo anterior de la Hipófisis**. Ed. Labor, Barcelona, 1934.
- 42.—YOEL CH.A. Gyneacología, 129: 190-209, 1950.
- 43.—SAUNDERS F. J. Endocrinology, 40: 1-7, 1947.
- 44.—BURDICK H.O. y MALCOLM C. Endocrinology, 48: 273-276, 1951.
- 45.—PHILLIPS R.W. Proc. Am. Soc. Anim. Prod. 222, 1935.
- 46.—CHANG M.C. y PINCUS G. Physiological Rew. 31: 1-26, 1951.
- 47.—BREWSTER J.E., MAY R. y COLE C.L. Proc. Am. Soc. Anim. Prod. 304, 1940.
- 48.—WHITNEY L.F. **How to breed dogs**. Orange Judd, Pub. N.Y., 1937.
- 49.—HEAPE W. Proc. Roy Soc. London. S.B. 79: 260, 1905.
- 50.—MCLEAN D. y ROWLANDS J.W. Nature, 150: 627, 1942.
- 52.—LEONARD S.L. y KURZOK. Endocrinology, 37: 171, 1946.
- 53.—HAMMOND J. y ASDELL S.A. J. Exp. Biol. 7: 155, 1926.
- 54.—HAMMOND J. J. Exp. Biol. 1: 140, 1934.
- 55.—HUSSAY B. Rev. Soc. Arg. Biol. 25: 22-26, 1945.
- 56.—SAN MARTIN y ZORRILLA T. Rev. Fac. Med. Vet. Vol. IV: 50-56, 1949.
- 57.—PINCUS G. **The eggs of mammals**. The MacMillan Comp. N. Y., 1933.
- 58.—CHANG M.C. J. Exp. Zool, 114<sup>o</sup> 197-225, 1950.
- 59.—id., id. Endocrinology, 48: 17-24, 1951.
- 60.—MURPHREE R.L., WARWIK E.J., CASIDA L.E., MCSHAN W.H. Endocrinology, 41: 308-311, 1947.
- 61.—KEHL R. y CHAMBON Y. Com R des Seances de la S. de Biol. et de ses Filiales, 143: 1169-1172, 1949.
- 62.—O'MARY C.C., POPE A.L. y CASIDA L.E. J. Anim. Sc. 9: 499-503, 1950.
- 63.—PAVLOV E.F. Zobs Biol. 10: 450-458, 1949.
- 64.—BOYARSKY L.H., BAYLIES H., CASIDA L.E. y MEYER R.K. Endocrinology, 41: 312-321, 1947.