

Tesis de Posgrado

Alteraciones en los esteres fosfóricos del músculo de ratones infectados con virus de influenza

Barcelona de Guerrero, Lucía

1961

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Barcelona de Guerrero, Lucía. (1961). Alteraciones en los esteres fosfóricos del músculo de ratones infectados con virus de influenza. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1107_BarcelonadeGuerrero.pdf

Cita tipo Chicago:

Barcelona de Guerrero, Lucía. "Alteraciones en los esteres fosfóricos del músculo de ratones infectados con virus de influenza". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1961.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1107_BarcelonadeGuerrero.pdf

ALTERACIONES EN LOS ESTERES FOSFORICOS DEL MUSCULO DE RATONES
INFECTADOS CON VIRUS DE INFLUENZA

RESUMEN

Lucía Barcelona de Guerrero
Dirigida por: Dr. Armando S. Parodi

-1961-

R. de Gen. 1107

En un trabajo anterior Parodi (4) determinó el fósforo inorgánico y orgánico presente en el líquido alantoideo de huevos de gallina embrionados, inoculados con virus de influenza tipo A y encontró un descenso significativo de la fosfocreatina y del fósforo total.

El presente trabajo continua esos estudios determinando fósforo inorgánico de fosfocreatina, ATP y ácido soluble total, en músculo de ratones blancos inoculados con virus de influenza, cepa Formosa.

MATERIALES Y METODOS

Animales: Se usaron ratones blancos adultos. Un lote se inoculó ip. con 0,2 ml de líquido alantoideo normal; y otro con 0,2 ml de líquido alantoideo infectado con virus de influenza, cepa Formosa, cuyo título hemoaglutinante era 1:1280; un tercer lote se inoculó con 0,2 ml de una mezcla de virus y antisuero totalmente neutralizada según pruebas de infectividad en embriones. Estos animales se sacrificaron a las 24, 48 y 72 hs. luego de la inoculación anestesiándolos con pentotal y sumergiéndolos luego en una mezcla de nieve carbónica-éter. Mientras estaban congelados se les extrajo músculo que se pesó en una balanza de torsión y luego se trató con Cl_3CCOOH al 5% en frío. Se filtró por un tubo de Barber y sobre este líquido libre de proteínas se hicieron las siguientes determinaciones de fósforo.

Determinación del fósforo:

- a) Fósforo inorgánico: Se llevó a cabo según el método de Lowry y Lopez (4).
- b) Fósforo de fosfocreatina: se dejó el filtrado libre de proteínas durante 1 hora a temperatura ambiente y sobre una parte alícuota se determinó fósforo según el método de Fiske-Subbarow (4).
- c) Fósforo de ATP: igual que el anterior pero se hizo previamente una hidrólisis de 10 minutos a 100°C en HCl 1N.

d) Fósforo ácido soluble total: igual que el anterior pero se hidrolizó 3 hs. a 100°C en ClH 1N.

Determinación del glucógeno muscular:

Se trató un trozo de músculo de ratones obtenidos como anteriormente con KOH al 30% en caliente, luego se precipitó glucógeno con 1,1 volumen de alcohol absoluto, se centrifugó y luego se hidrolizó en medio ácido. Se determinó glucosa según el método de Valverde (4).

Obtención del antisuero específico:

Se inoculó un conejo adulto por vía intramuscular con 0,5 ml de líquido alantoideo infectado con virus de influenza más 1 ml de adjuvante de Freund. Se lo sangró por punción cardíaca a los 15 días y se obtuvo el suero.

Determinación de infectividad en músculo:

Se tomó una porción del músculo de la pata de ratones inoculados con virus de influenza, se maceró con caldo con antibióticos (penicilina y estreptomocina), se centrifugó y se usó el sobrenadante. Este se inoculó en diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} en cavidad alantoidea de embriones de pollo de 11 días de incubación. Los embriones se mantuvieron 24 horas a 37°C y luego se mataron por frío y se extrajo líquido alantoideo, con el que se realizó una reacción de hemoaglutinación.

Resultados:

En la Tabla I se presentan los promedios, las desviaciones standard, y los valores de t (para el ensayo t) para las determinaciones de ésteres fosforados.

TABLA I

Inóculo	Hs.	P.inorg.	t	P. de fosfoor.	t	P. de ATP	t	P.total	t
Normales		31,6±5,6		31,0±4,9		33,3±5,9		105,7±9,8	
# F	24	31,6±4,9	0	26,8±3,6	2,4	22,3±3,1	7,1	89,2±6,0	3,
	48	28,2±5,7	1,71	24,6±3,6	3,6	22,8±2,8	17,5	88,3±9,6	4,
	72	29,4±4,2	1,20	20,9±4,1	16,8	24,4±3,6	4,96	83,8±7,8	5,
Líquido Alant.	24	30,9±8,9	0,29	30,8±4,3	0,24	29,6±3,7	1,97	101,2±8,8	1,
Normal	48	30,8±4,0	0,49	37,6±6,4	2,50	31,6±4,0	0,75	111,1±8,5	1,
	72	31,7±6,3	0,03	34,7±5,1	2,00	29,8±3,7	1,9	104,4±7,0	0,
# F + AS	48	35,2±4,1	1,68	20,3±6,1	4,58	24,7±7,9	3,64	95,8±7,2	1,

A las 24, 48 y 72 horas luego de la inoculación se observa un descenso significativo de la fosfocreatina, ATP y fósforo total. Esto no ocurre en los animales controles.

Los valores de glucógeno muscular se dan en la Tabla II.

TABLA II

Determinación del glucógeno

Inoculo	Horas	Glucógeno min. max.
6	48	240 - 480
	72	220 - 450
	96	170 - 350
	120	220 - 350
	144	230 - 470
	48	290 - 400
Normales	72	220 - 490
	96	170 - 400
	120	220 - 350
	144	280 - 450
		220 - 485

No se observan variaciones en el contenido del glucógeno muscular de los ratones infectados.

Los extractos de músculo de los ratones infectados con virus que fueron inoculados en embriones de pollo no demostraron poseer ninguna actividad infecciosa.

DISCUSION

El virus de influenza provoca cambios metabólicos en los huéspedes en los cuales desarrolla. En huevos de gallina embrionadas se han encontrado variaciones en el volumen del líquido alantoideo, de su pH, del peso de la membrana corioalantoidea y de la glicólisis anaerobia de la membrana corioalantoidea.

Una de las alteraciones más importantes es la detención de su desarrollo, fenómeno que se ha relacionado con el metabolismo del fósforo y sus ésteres, especialmente de la fosfocreatina y del ATP. Pappalardo (1936) encuentra un aumento en la cantidad total de creatinina y creatina en el líquido alantoideo de embriones infectados, Parodi (1938) observa una notable disminución de la fosfocreatina en los embriones infectados que comienza a las 4 hs., se acentúa a las 7 hs. y vuelve a sus valores normales a las 24 hs. luego de la inoculación. También observa un descenso del fósforo inorgánico y del fósforo ácido soluble total.

En este trabajo se trató de observar si existían alteraciones similares en ratones infectados intraperitonealmente con el virus de influenza.

Se ha encontrado un descenso significativo del fósforo proveniente de la fosfocreatina y del ATP, así como del fósforo ácido soluble total.

Los valores hallados en ratones inoculados con líquido alantoideo no infectado no muestran variaciones con respecto a los normales, salvo en un caso (a las 48 hs. el fósforo del ATP aumen-

ta) al cual no le atribuimos significado.

Las determinaciones de virus infeccioso en el músculo del animal infectado han dado resultado negativo; tampoco se ha encontrado variación en los valores del glucógeno muscular aunque éstos oscilan, en todos los casos, dentro de límites muy amplios.

Siendo la fosfocreatina la fuente de fosfatos para la resíntesis del ATP una disminución en los valores de ambos hace pensar en la inhibición del proceso de síntesis de la primera que se reflejaría también en los valores del segundo.

Un efecto análogo se encuentra en los músculos "envenenados" con iodoacetato en los cuales desaparece la fosfocreatina, aunque se encuentra un aumento del fósforo inorgánico y de la creatina. Este efecto se atribuye a la inhibición de la gliceraldehído-3 fosfato dehidrogenasa y al bloqueo de la resíntesis del ATP a partir del ATP.

Dado que en el músculo no se encuentra virus infeccioso, se puede pensar que éste ejerce una acción tóxica que se manifiesta de esta manera. Dicha acción podría deberse a la partícula en sí o bien a alguna subunidad derivada de ella. Es conocida la toxicidad que tiene el virus de influenza. Hasta hace poco se pensaba que dicha toxicidad se debía a la partícula completa, pero en un reciente trabajo Kato y Okada (1952) han desintegrado el virus por ultrasonido y han encontrado que a pesar de la pérdida de infectividad, la toxicidad no disminuye y en algunos casos aumenta. Sugieren que la acción tóxica se debería a una proteína o lipoproteína fuertemente adherida a la hemoaglutinina, aunque parte de ella permanece unida al antígeno s.

Una observación semejante de acción tóxica que provoca un descenso de la fosfocreatina es el hallado por Pinchet y Blocv (1954) al inocular toxina diftérica en ratas por vía subcutánea.

De todas maneras, las experiencias anteriores indican que la acción tóxica es neutralizada por el antisuero específico. En cambio en este trabajo no se consiguió neutralizar el descenso del fósforo por la inyección simultánea del virus y del antisuero neutralizante, salvo en el caso del fósforo total.

Esto podría explicarse si el descenso del fósforo se debiera a subunidades derivadas de la partícula viral y contra las cuales no hubiera anticuerpos en el conejo, a pesar de que el virus se descompone en unidades menores al infectar las células o tejidos.

Por otra parte se debe tener en cuenta una posible acción debida al interferon. Se sabe que las células normales a las cuales se les agrega interferon aumentan su consumo de O_2 así como su producción de ac.láctico, pero el proceso de glicólisis queda desconectado de la producción de ATP, pensándose que la falta de este último es un factor importante en la acción del interferon frente a los virus, dado que ellos precisan del ATP para sus procesos sintéticos. Podemos pensar entonces que nuestros descensos del ATP y fosfocreatina pueden ser causados por la acción del interferon que fabricaría el animal al ser inoculado o por su presencia en el líquido alantoideo infectante.

CONCLUSIONES

- 1.-Se hicieron determinaciones del fósforo inorgánico, del de fosfocreatina, ATP y ácido soluble total en ratones blancos inoculados con virus de influenza y en controles inoculados con líquido alantoideo normal.
- 2.-Se observó un descenso significativo en la fosfocreatina, ATP y fósforo total.
- 3.-Se discuten los resultados obtenidos y se propone su interpretación.

Lucio Belyuznev

Alan

FCV/BA

FCV/BA

FCV/BA

FCV/BA

FCV: 1107

FCV/BA

INTRODUCCION

El virus de influenza es uno de los virus animales más conocidos y estudiados y tal vez uno de los más ampliamente distribuidos en la naturaleza.

El estudio de sus propiedades y más precisamente el de las alteraciones metabólicas que produce, además de facilitar el conocimiento sobre los virus en general, trata en lo posible de comprender su modo de acción para eliminar o disminuir los efectos de su infección, que afectan a gran número de individuos.

El presente trabajo se referirá a la acción del virus sobre el metabolismo fosforado del músculo y el nivel de glucógeno en el mismo.



HISTORIA

La existencia de influenza, apareciendo en epidemias o pandemias, se reconoce a través de descripciones que datan de varios siglos atrás.

En la pandemia de 1743 en Londres se la llamó "influenza", derivando el nombre de la frase italiana que atribuía el origen del mal a "una influenza de freddo"(1). A fines del siglo XVIII se comenzó a sospechar que la enfermedad era infecciosa y contagiosa. Sin embargo recién en la pandemia de 1889-92 se recopilaron datos bacteriológicos que llevaron a Pfeiffer a considerar al H.influenzae como responsable de esta infección.

El conocimiento moderno de la etiología de la influenza comienza en 1933 cuando Smith, Andrewes y Laidlaw (2) aislaron en hurones un virus proveniente de un caso humano de influenza, el cual era neutralizado por anticuerpos que aparecían posteriormente en el organismo del enfermo.

Este virus se conoce actualmente como Tipo A. En 1940 Fran

cis (3) identificó un segundo tipo de virus, el B, diferente antigénicamente del anterior, y en 1950 se aisló (4) otro tipo, el C, de un pequeño brote de influenza.

Más recientemente se ha aislado en Japón de un caso de pneumonitis, un virus que según estudios antigénicos, está relacionado con los anteriores, y al que se ha designado como tipo D (virus Sendai) (5). Dentro de los distintos tipos, especialmente dentro del A y B se encuentran variantes que se clasifican en distintos sub-tipos.

TAMAÑO - MORFOLOGIA - COMPOSICION

El tamaño del virus de influenza ha sido determinado por estudios de microscopía electrónica, ultracentrifugación y filtración a través de membranas de gradocol. Todos los datos coinciden en que las partículas tienen un diámetro de 80 a 120 $m\mu$ (6) (7) El tipo B es algo más grande que el A.

El microscopio electrónico ha permitido observar las partículas elementales de cepas adaptadas a pulmón de ratón y cavidad alantoidea de embriones de pollo. Son partículas esféricas u ovoidales y ocasionalmente se observan formas filamentosas.

Las partículas virales se pueden identificar estructuralmente sólo en la superficie de la célula infectada (8) (9). La forma esférica se diferencia cerca de la superficie celular. Al atravesar la membrana cada partícula de 20 a 22 $m\mu$ de diámetro adquiere una membrana bien definida de 40 a 45 $m\mu$ de diámetro y una capa difusa que lleva el diámetro total a 70 $m\mu$ (9).

Las formas filamentosas parecen formarse por extrusión. En corte longitudinal se observa que los filamentos tienen el mismo diámetro que las esferas, pero carecen de su estructura interna lo mismo que las formas no infecciosas. Esto se verifica en cortes celulares y por centrifugación del virus y posterior microscopía electrónica (10). Las formas filamentosas que pare-

cen predominar en cepas recién aisladas (11) poseen menos RNA que las esferas (12) y son rápidamente digeridas por la tripsina (13). Morgan y colaboradores (9) consideran que estos filamentos no son infecciosos. Por disrupción sónica de los filamentos aumenta el título aglutinante pero no la infectividad (14). Como esta última está directamente relacionada con el contenido en RNA (15) (16) se puede pensar que los filamentos son poco infecciosos, localizándose esta propiedad en una zona del mismo, generalmente su extremo libre, donde se observa un enriquecimiento en RNA (17) (18). De este punto podría luego originarse una partícula esférica por un proceso similar a la brotación. Existe alguna evidencia que apoya estas ideas, pero también es cierto que las esferas no se producen en forma característica por segmentación del filamento.

En un trabajo reciente, Kilbourne y Murphy (19) encuentran que ambas formas están regidas genéticamente. Mediante experiencias de recombinación a partir de una cepa asiática A2 filamentosa, y otra PR8 esférica, no infecciosa, han obtenido recombinantes esféricos con características antigénicas A2.

Por tratamiento con éter el virus se desintegra liberando dos partículas más pequeñas: una es el antígeno soluble que contiene casi toda la ribonucleoproteína, 5,3% de RNA, y la otra es la hemoaglutinina de naturaleza mucoproteica, la cual lleva el grupo que se combina con las células y la actividad enzimática. La primera constituye alrededor del 14% del peso de la partícula entera, la segunda el 13%. (20) (21) Se considera que hay además 38% de material no proteico del cual 3,5% son hidratos de carbono y 34,5%, lípidos.

El antígeno soluble o antígeno s, es muy pequeño, se observa en forma de varillas de 15 μ de diámetro y 55 a 140 μ de largo (22), sólo se produce por la infección y no se obtiene por vacunación. Es capaz de fijar el complemento y lleva la es-

pecificidad de grupo. La hemoaglutinina es un complejo de proteina e hidrato de carbono y tiene 30 $m\mu$ de diámetro según Davenport (22) o 35-40 $m\mu$ según Paukner y colaboradores (23).

La partícula completa estaría formada por una capa externa de hemoaglutinina cementada por lípidos; en el interior se encontrarían 6 unidades de antígeno s. Por microscopía electrónica de partículas seccionadas por su centro se encuentran 4 a 8 gránulos densos de 10 a 15 $m\mu$ de diámetro, lo que concordaría con lo anterior (24).

Por hidrólisis de sus polisacáridos se encuentra manosa, galactosa, fucosa y glucosamina (25).

HEMOAGLUTINACION

En 1941 Hirst (26) por un lado y McClelland y Hare (27) por otro encontraron que los líquidos alantoideos de embriones de pollo inoculados con influenza aglutinaban los eritrocitos de pollo. Hirst (28)(29) estudió ampliamente el fenómeno y demostró

- a) que la aglutinina es idéntica a la partícula infecciosa,
- b) que el calor y el formal pueden destruir la infectividad del virus pero se mantiene la capacidad aglutinante,
- c) que el virus, luego de adsorberse sobre el eritrocito puede eluirse semejando esto una acción enzimática, y
- d) que la hemoaglutinación puede ser inhibida por anticuerpos específicos y en menor grado por algunos sueros normales.

La aglutinación de los glóbulos rojos se debe a la adsorción de las partículas virales sobre los receptores mucoproteicos ubicados en su superficie; el virus actúa como polivalente, o al menos bivalente, uniéndose a receptores de distintas células, formando puentes entre uno y otro eritrocito, aglutinándolos. Además de la acción hemoaglutinante unida a la partícula completa, se encuentra que tratando el virus conéter se libera una subunidad más pequeña que también posee dicha propiedad.

Usando virus activo se puede determinar la correlación entre infectividad y aglutinación, habiéndose establecido una relación de aproximadamente $10^{-6,17}$ y $10^{-6,32}$ HI₅₀ por cada unidad hemoaglutinante (30). Este fenómeno se observa tanto a 4° como a 37°C.

Según Miller y Stanley (31) el título aglutinante aumenta con la temperatura, pero el efecto más importante de ésta es la aceleración de la reacción.

Es necesaria la presencia de electrolitos en el medio para que se produzca la aglutinación. Con la cepa PR8 no se la obtuvo con concentraciones de cloruro de sodio inferiores a 0,043 M (32). La cepa Lee actúa en forma similar (33). Burnet y Edney encontraron que para sales con cationes monovalentes, son necesarias concentraciones de 0,01 M aproximadamente; los cationes divalentes son más activos (34). La naturaleza del anión parece no tener mayor efecto (35). La óptima aglutinación del virus de influenza se observa entre pH 6 y 8 (31). Este virus aglutina eritrocitos de varias especies, los más sensibles son los de pollo, hombre y cobayo. Las cepas de Tipo A recién aisladas en cavidad amniótica de embriones de pollo, aglutinan con mayor título los eritrocitos de cobayo que los de pollo (36). Se dice que estas cepas se encuentran en la fase O (original). Al adaptarse el virus por sucesivos pasajes en embrión, aparecen mutantes que predominan y entonces el virus además de desarrollar muy bien en cavidad alantoidea aglutina con mayor título los glóbulos rojos de pollo; se encuentra en la fase D (derivada) que es la estable en las cepas adaptadas a huevo.

La capacidad aglutinante del virus de influenza es relativamente resistente a la luz ultravioleta; ésta destruye primero y en este orden la infectividad, toxicidad, antigenicidad, capacidad de elución y luego la hemoaglutinación y los antígenos fijadores de complemento (37).

El calentamiento a 56°C durante 30 minutos destruye la infectividad pero no la hemoaglutinabilidad; ésta puede resistir hasta 67°C durante 30 minutos, según las cepas (38). El ion periodato es capaz de destruir la hemoaglutinina (39). La tripsina en cambio no la ataca, pero reduce su capacidad enzimática (20) (40). Tyrrell y Horsfall destruyeron la aglutinina de varias cepas con urea 5M a 37°C (41). A 4°C se conserva el poder aglutinante durante varios meses, por lo menos.

Luego de la adsorción de las partículas virales sobre la superficie de los eritrocitos se observa su elución espontánea. Esta es más pronunciada a 37°C y se la interpreta como debida a una acción enzimática ejercida por el virus sobre los receptores mucoproteicos del glóbulo rojo. Una vez que el virus se ha eluido de los eritrocitos, estos no son capaces de ser aglutinados por nuevas porciones del mismo virus— y se dice que son estables. En cambio el virus eluido es capaz de actuar indefinidamente sobre nuevos eritrocitos, lo que confirma la idea de la destrucción de los receptores celulares por la enzima del virus. La elución es despreciable a 0°C pero mucho más rápida a 37°C (23)

Las células pueden ser nuevamente aglutinadas por otras cepas de mixovirus. Burnet (42) estableció un gradiente de virus, de modo que unos eritrocitos estabilizados por una cepa, no son aglutinables por ninguna otra cepa anterior a la primera en el gradiente, pero sí por las subsiguientes.

El orden de algunas cepas es: paperas, enfermedad de Newcastle, influenza A (MEL, WS, LEE, BAL, MIL), influenza B e influenza porcina; y resulta igual para eritrocitos humanos o de ave.

Luego de la elución del virus, se observa que la movilidad electroforética de los glóbulos rojos ha disminuido hasta un valor característico para cada virus, y la proporción de la disminución está correlacionada con la posición del virus en el gra-

diente.

La enzima es destruida por calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Se mantiene la capacidad aglutinante pero el virus así tratado no puede eluir (43).

En 1946 Burnet y colaboradores (44) descubrieron en filtrados de cultivos de *V. cholerae* una enzima que actúa sobre los glóbulos rojos en forma análoga a la del virus de influenza. Se la conoce con las siglas RDE (enzima destructora de receptores). Se inactiva por calentamiento a 52°C durante 30 minutos en ausencia de calcio. En presencia de este último en una concentración de 0,01 N resiste hasta 60°C. Es destruida por la tripsina y es antigénica (40) (45). Esta enzima se adsorbe sobre los glóbulos rojos y destruye los receptores, haciendo a las células no aglutinables por ninguno de los mixovirus; para actuar necesita calcio y el pH óptimo es 6,8 (46).

El estudio de estas propiedades ha permitido aclarar parte del mecanismo por el cual se fijaría el virus a las células que luego va a infectar. Se ha comprobado que las células del epitelio respiratorio y las que tapizan la membrana coricalantoidea tienen en su superficie receptores de naturaleza similar a los presentes en los eritrocitos; el virus se adsorbería a ellos como paso previo a su penetración en la célula. Si se hace actuar la RDE sobre la membrana coricalantoidea, eliminándola luego mediante lavados e inoculando con influenza en pequeña cantidad, se observa que durante varias horas la membrana no es sensible al virus, al cabo de las cuales recién comienza la infección (47). Esto se explica por la destrucción de los receptores celulares mediante la acción de la enzima lo que impediría la adsorción del virus sobre la célula y su posterior invasión. Al cabo de unas horas las células han regenerado los receptores y comienza entonces la infección. Si el inóculo de virus es muy grande este efecto no se observa. Ejerce una acción similar sobre las célu-

las del epitelio pulmonar, según experiencias realizadas con ratones (48). El virus de influenza también se adsorbe sobre los leucocitos en los cuales provoca una disminución de su capacidad de fagocitosis (49) (50), así como alteraciones metabólicas (51)(52).

La aglutinación es inhibida específicamente por sueros inmunes. Esto proporciona un método sencillo y económico para la titulación de dichos sueros.

Francis (53) observó que la hemaglutinación del virus calentado a 56°C es inhibida por el suero normal. Anderson (54) y McCrea (55) demostraron que esta acción era debida a la presencia de sustancias de naturaleza mucóide. Al virus con esta característica se lo conoce como virus indicador (56), debido a que permite reconocer la presencia de los inhibidores y puede usarse para titularlos. La mayor sensibilidad del virus calentado, frente a estos inhibidores se atribuye a efectos estéricos, es decir, el calentamiento provocaría una alteración de la superficie viral que permitiría el acceso de los inhibidores hasta las porciones sensibles del virus (57).

Estas sustancias están presentes en otros fluidos orgánicos como orina (58)(59), saliva (60)(61), extractos de tejidos, lágrimas (56), meconio humano, albúmina de huevo (62), etc.

Algunas de ellas son termolábiles y se pueden eliminar por calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Otras en cambio son termoestables y es necesario recurrir a otros métodos para su eliminación.

El inhibidor α es termoestable y se destruye por la acción de la RDE y del ion periodato, es más activo contra el virus calentado y se lo identifica con el inhibidor de Francis. Se obtiene casi libre de otros inhibidores a partir de la albúmina de huevo. En el suero bovino se encuentra en gran proporción el inhibidor β , termoestable, no sensible a la RDE ni al

periodato. Actúa con mayor efectividad sobre las cepas tipo A' no calentadas.

Ultimamente Cohen (63) ha encontrado otro inhibidor que considera distinto a los anteriores que se halla en el suero equino, y al que llamó inhibidor γ ; es sensible a la tripsina pero no a la RDE y actúa preferentemente sobre la cepa asiática.

El inhibidor de Chu es termolábil, se destruye entre 56° y 62°C según su origen (64)(65). Es resistente al periodato y precipita en la fracción de las γ globulinas.

Se conocen cepas de virus que no son sensibles a la acción de estos inhibidores pero todas ellas ya están muy adaptadas a huevos y se piensa que esta adaptación ha provocado dicha resistencia. Las cepas de influenza sensibles al inhibidor β pueden volverse resistentes por adaptación al pulmón de ratón; esto se debería a la presencia del inhibidor en el tejido, que actuaría ejerciendo una acción selectiva. Cohen ha obtenido variantes resistentes al inhibidor γ , por adaptación a pulmón de ratón. Este no es el caso anterior pues no encontramos al inhibidor en el tejido pulmonar, y por lo tanto se supone que existen partículas resistentes y otras sensibles que son variantes genéticamente estables, que se puede seleccionar por pasajes del inoculo inicial.

Al titular un suero inmune por la técnica de inhibición de aglutinación, es necesario destruir los inhibidores no específicos. Los reactivos de las técnicas usuales son: calor, periodato, RDE, CO₂, tripsina, una combinación de periodato y tripsina (66) y últimamente Spence (67) preconiza el caolín que elimina todos los inhibidores no específicos.

La unión de estos inhibidores con el virus activo no es permanente y luego de un período de incubación a 37°C el virus se libera alterando la composición del inhibidor. Gottschalk (68)

Los investigadores posteriores reconocieron que estos inhibidores así como los receptores celulares son proteínas conjugadas cuyo grupo prostético es un polisacárido relativamente pequeño. Todos ellos contienen un resto de ácido siálico generalmente en posición terminal (69) y unido glucosídicamente al resto adyacente. La enzima viral rompe esta unión, liberando ácido N-acetil neuramínico o ácido siálico. Se trata de una α -glucosidasa a la cual se llama neuraminidasa (70).

La ordenación espacial del polisacárido así como del resto proteico es esencial para atraer y unir al virus de influenza. Tanto la liberación enzimática del ácido neuramínico como el rompimiento del resto proteico anulan la capacidad de inhibición (71). De ahí que la tripsina sea capaz de inactivar algunos inhibidores. Debido a las diferencias en composición química así como en ordenamiento estérico de cada cepa de virus, éstas se comportan en forma distinta frente a cada inhibidor. Esto explicaría la existencia del gradiente frente a los receptores celulares y sería de esperar que la posición de virus en él variase según el receptor o inhibidor tomado como referencia. Esto ha sido comprobado experimentalmente (72)(73).

INEFECTIVIDAD

El virus de influenza desarrolla bien en varios huéspedes. Inoculando por vía intranasal filtrados de gárgaras de enfermos puede transmitirse la infección al murón. Luego de un período de incubación de 48 hs. el animal tiene fiebre, descargas nasales y pérdida de apetito. Los ojos se congestionan y el pelo se eriza.

El virus está esencialmente localizado en el tejido respiratorio. Estos síntomas duran 4 ó 5 días y luego el animal se recupera, aparecen en sangre los anticuerpos específicos y el animal queda inmune durante un tiempo. Al cabo de pocos meses inoculando intranasalmente el mismo virus, reaparecen los síntomas.

Las distintas cepas de cada tipo tienen diferente capacidad para provocar estos síntomas clínicos. Las cepas del tipo B producen una enfermedad más leve y generalmente se adaptan con más lentitud. Parece que el desarrollo de cepas del tipo C se limita al epitelio respiratorio, pero la aparición de los anticuerpos denuncia la enfermedad.

Un paso muy valioso para el estudio del virus de influenza fué su adaptación a ratón blanco (74)(75). La inoculación intranasal de virus proveniente de hurones o de casos humanos, y pasajes sucesivos cada dos o tres días de suspensión de pulmón, da por resultado una adaptación del virus que provoca entonces una enfermedad pulmonar fatal. El tiempo de sobrevivencia del animal es una buena medida de la concentración del virus; si el inóculo es grande puede producir la muerte en dos o tres días; si más diluido tarda hasta 10 a 14 días. En la autopsia los pulmones presentan focos neumónicos, pudiendo las lesiones abarcar totalmente ambos pulmones y en casos no fatales, sólo unas pequeñas zonas.

Las cepas muy adaptadas por inoculación intraperitoneal en ratones blancos pueden provocar lesiones pulmonares debidas probablemente a una viremia que permite localizar el virus en el tejido respiratorio (76).

Las cepas del tipo B son menos virulentas y tienen menos título que las cepas A. Las cepas del tipo C tampoco se han adaptado a pulmón de ratón, permanecen en el epitelio nasal.

Una cepa del tipo A, la WS, se ha adaptado a cerebro de ratón y se puede mantener como cepa neurotrópica (77) (78).

El huevo de gallina embrionado es, tal vez, el huésped más adecuado. Se pueden aislar nuevas cepas inoculando gárgaras de enfermos en saco amniótico (79), luego de 2 ó 3 pasajes el virus se adapta al embrión y desarrolla muy bien en cavidad alantoidea. El virus se propaga en las membranas embrionarias y se

acumula en los fluidos extraembrionarios. También se observa aquí su tropismo característico hacia el tejido respiratorio (79). Las cepas tipo C desarrollan mejor en saco amniótico que en cavidad alantoide. Algunas cepas muy adaptadas son capaces de matar al embrión al cabo de 48 hs. El desarrollo y título final del virus dependen de varios factores: temperatura, tiempo de incubación, edad del embrión y características del inóculo. Este último es el de mayor importancia. La inoculación de grandes cantidades de virus, del orden de 10^9 DI₅₀ puede dar un rendimiento de virus activo menor que el obtenido con inóculos más diluidos. Esto se debe a un ciclo de desarrollo incompleto del virus; se forman grandes cantidades de partículas, según resulta de otros ensayos, pero una gran proporción de las mismas no adquiere la capacidad infectante. Este ciclo incompleto se hace más evidente luego de dos o más pasajes seriados con inóculos masivos. (80) Un método muy útil es la inoculación de huevos de embrionados. (81)

El virus de influenza se cultivó por primera vez "in vitro" en el medio de Li y Rivers (macerado de embrión de pollo en solución Tyrode) (82). Posteriormente se han usado membranas corioalantoideas completas en solución salina balanceada (83). Estos cultivos han sido muy útiles y han confirmado estudios sobre las curvas de crecimiento hechos en el huevo completo. Aquí también se observa un período posterior a la inoculación en el cual no hay producción de virus y luego éste comienza a aparecer. Es un proceso continuo que dura varias horas, cada generación se produce a intervalos de 5 a 6 horas (84). Se ha observado acción citopatogénica del virus en cultivos de epitelio respiratorio (85) y otras células (86)(87).

TOXICIDAD

La inoculación intracerebral, intraperitoneal o subcutánea del virus de influenza en ratones, ratas o cobayos produce

la muerte del animal entre las 8 y las 96 horas siguientes. Todos los ensayos tendientes a determinar la presencia del virus en los tejidos extra-respiratorios dan resultado negativo. Por lo tanto se atribuye este efecto a una acción tóxica del virus. La toxicidad no ha podido obtenerse aislando alguna fracción de la partícula infecciosa mediante ultra centrifugación diferencial, adsorción y elución sobre glóbulos de pollo y precipitación con protamina. El efecto tóxico del virus A es específicamente neutralizado por el suero anti-A y no por el anti-B y viceversa. La toxicidad no se altera durante 2 a 3 meses a 4°C (88)(89).

Otra forma de reacción tóxica se observa en el hombre luego de la inyección subcutánea del virus; su severidad es directamente proporcional a la cantidad de virus (90). La acción tóxica de la cepa PR8 y de la neurotrópica NWS inoculadas intracerebralmente en ratón, es neutralizada por gangliósido cerebral, inoculado simultáneamente una o dos horas antes que el virus (91). Parece que existe una acción competitiva entre el gangliósido inyectado y el presente en las células nerviosas del animal.

MULTIPLICACION

Luego de la inoculación del virus de influenza en cavidad alantoidea se produce un período de incubación de duración variable según las cepas. Por mediciones de hemoaglutinación en esta fase se ha observado que el 90% de la hemaglutinina viral ha sido absorbido por las células de la membrana corioalantoidea (92). Esto se ha comprobado también mediante estudios con virus marcado con P³², midiendo la radioactividad residual del líquido alantoideo luego de 1½ hs de la inoculación (93). Sin embargo, si la membrana se desintegra y se incuba a 37°C para permitir la elución del virus de las células, no se encuentra hemoaglutinación (94). Este estudio se hizo sin eliminar los inhibidores celulares que podrían haber interferido en la reaco-

ción. Más adelante se repitió esto usando RDE y sólo se pudo reconocer 1% de la hemoaglutinina absorbida por las membranas (95). También se hicieron determinaciones de actividad sialidásica (enzimática) de las membranas infectadas, pero no se la pudo demostrar. La determinación de partículas infectantes también ha dado resultado negativo. El hecho de que durante el período de incubación no sea posible hallar actividades hemoaglutinante, enzimática o infectante hace pensar que las partículas virales sufren una fuerte alteración al penetrar en la célula. Por distintas experiencias se ha llegado a la conclusión que la pequeña cantidad de virus detectable durante este período es extracelular; todo lo anterior indica que se produce una fase de eclipse luego de la entrada a la célula. Este un fenómeno general para los virus animales.

Por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes (96) se han hecho estudios interesantes. Breitenfeld y Schäfer (97) marcaron con isotiocianato de fluoresceína anticuerpos contra el antígeno soluble y la hemoaglutinina de un virus del tipo A y observaron la localización de la fluorescencia en células de embrión de pollo infectadas. Encontraron que el antígeno soluble aparece luego de 3 horas de la infección y se localiza en el núcleo de la célula, que entonces contiene unos gránulos brillantes. A las 5 hs. la fluorescencia comienza a difundir hacia el citoplasma y no se notan alteraciones en el núcleo. Alrededor de 14 horas después, toda la célula muestra fluorescencia. En cambio la hemoaglutinina se detecta a las 4 hs de la inoculación pero en el citoplasma y no en el núcleo. La hemoaglutinina migra hacia los bordes de la célula y a las 14 hs aproximadamente la célula presenta su periferia intensamente fluorescente. Un reciente trabajo (98), hecho con cepa PR8 inoculada en cultivo de células de pulmón de embrión de pollo, confirma lo anterior. Todo esto indica que las distintas partes del virus se forman en diferentes sitios de la célula y que su unión final se lleva a

cabo en la proximidad de la pared celular, de la cual tomarían al atravesarla, el material lipídico que cementa las partículas virales.

EFEECTO DEL VIRUS EN LOS TEJIDOS INFECTADOS

En el embrión de pollo: Diversos investigadores han estudiado las alteraciones que provoca en distintos organismos el desarrollo del virus de influenza. En el embrión de pollo se ha observado un aumento de volumen del líquido alantoideo, aumento del peso de la membrana corioalantoidea y disminución del peso total del embrión (99). Desde el punto de vista químico se observa: aumento de la creatina y creatinina y disminución de la fosfo-creatina (100). Pappalardo encuentra un aumento del nitrógeno proteico, del ácido úrico y de la creatinina (101). También se ha observado diferencias en los aminoácidos de las proteínas de los líquidos alantoideos normales e infectados (102). Arnbruster y Buss (103) encontraron, mediante estudios cromatográficos de la fracción lipídica del líquido alantoideo, un aumento de los lípidos totales pero una disminución de los fosfátidos. También Lenti y colaboradores (104) advirtieron un aumento de la actividad ATP-ásica de la membrana corioalantoidea infectada con cepa PR8, efecto que se intensifica por el agregado de ácido glutámico. También se observa una acumulación de ácido pirúvico en las membranas corioalantoideas infectadas (105). La glicólisis anaerobia de las membranas infectadas con virus A aumenta significativamente a las 40 hs aproximadamente (106). El pH del líquido alantoideo durante el desarrollo del virus de influenza tiene mucha importancia. Si el pH inicial es menor de 6,6 no hay desarrollo (107). Una vez iniciado éste, el pH aumenta progresivamente hasta 7,5. En huevos normales de igual edad que los inoculados el pH es mucho menor. De aquí que no sean tan adecuados para inocular los embriones de más de 14 días.

En un trabajo reciente Rafelson extrae RNA con fenol de mem-

branas corioalantoideas normales e infectadas y comprueba que ambos RNA son diferentes (108).

Ya dijimos que el virus de influenza es capaz de adsorberse sobre los leucocitos de cobayo reduciendo la capacidad de fagocitosis (50) y reduciendo la glucólisis en forma proporcional al número de virus presente. Para esto son necesarios los iones Ca^{++} . El efecto se observa si en vez de glucosa se usa como sustrato glucosa -6 fosfato. En cambio con fructosa -6 fosfato o fructosa 1-6 fosfato, no hay reducción. Se piensa que el virus inhibe la fosfohexoisomerasa o la hexoquinasa (51)(52).

PARTE EXPERIMENTALDeterminación de fósforo.

Los ésteres fosforados se determinaron por hidrólisis y posterior medición del fosfato inorgánico liberado. En el caso del músculo se determinó primero fósforo inorgánico presente como tal, luego se hidrolizó la fosfocreatina y se determinó fosfato. Esta cifra menos la anterior nos dió el fósforo correspondiente a dicho éster; luego sucesivamente se hidrolizó el ATP y por último se hizo una hidrólisis total, determinándose así todos los ésteres fosforados.

$$\text{En resumen: } P_T = P_I + P_{FC} + P_{ATP} + P_X$$

P_T = fósforo total, P_I = fósforo inorgánico, P_X = otros ésteres.

P_{FC} = fósforo de fosfocreatina y P_{ATP} = fósforo de ATP.

El fosfato se determinó por el método de Fiske Subbarow (109), con la modificación de Lowry-Lopez (110) en el primer caso, para evitar la hidrólisis prematura de la fosfocreatina.

A) Método de Lowry-Lopez

Reactivos: Solución tipo de PO_4H_2K	0,04 mg/ml
Cl_3 CCOOH 5%	
$MoO_4(NH_4)_2$ 1% en SO_4H_2	0,05 N
Acido ascórbico al 1%	
Buffer pH 4: CH_3COOH 0,1 N + CH_3COONa	0,025 N
$SO_4Cu \cdot 5H_2O$	$4 \times 10^{-6} M$

Al método de Lowry-Lopez se le agregó el uso de Cu^{2+} pues acelera la reacción (111) permitiendo leer a los 5 minutos y además cuando se trabaja frente al extracto muscular, el Cu^{2+} compleja el S^{2-} , proveniente de algunas proteínas, que molestan la reacción.

Este método adapta el de Fiske-Subbarow a un pH más alto de manera que la fosfocreatina no se hidroliza.

B) Método de Fiske-Subbarow

Sol. tipo de fosfato, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,04 mg/l

$\text{Cl}_3\text{CCO}_2\text{H}$ 5%

$\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_2$ 12,5g en 100 ml H_2O + 150 ml SO_4H_2 10 N

Llevar a 500 ml con agua.

Ac. Amino naftol sulfónico (ANS) 0,25 g. %

0,5 g de ANS 195 ml SO_3HNa al 15% + 5 ml SO_3Na_2 anhidro al 20%.

Determinación de glucógeno

El glucógeno muscular se extraje por disolución del músculo, en KOH, precipitación del glucógeno con alcohol y su posterior hidrólisis ácida, determinándose luego glucosa por el método de Valverde (112).

1.- $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ 0,005 N alcalino

1,65 g de ferricianuro en 100 ml de H_2O

10,6 g de CO_3Na_2 anhidro en 300 ml de H_2O

Mezclar y llevar a 1.000 ml

2.- Cl_3CCOOH 3%

3.- SO_4Zn 10%

4.-Glucosa 1% en ác. benzoico 0,25%

0,5 ml de la sol. anterior llevarlos a 10ml. Solución de glucosa 0,5 mg/ml

TECNICAS**A- Determinación de ésteres fosforados**

Se determinaron en ratones blancos normales e inoculados con el virus de influenza cepa F, a distintos tiempos luego de la inoculación. En ambos casos la técnica seguida fué la misma.

El animal se anestesió con pentotal sódico inyectado intraperitonealmente. Cuando sufría alguna contracción se lo desechaba. Una vez dormido se lo sumergió en mezcla de éter-hielo, seco, congelándolo instantáneamente.

Mientras el animal estaba congelado se le sacó la piel de la pata y se tomaron alrededor de 150-200 mg de material, con especial cuidado de no rozar el hueso. Estos trozos se pesaron rápidamente en una balanza de torsión y se colocaron en un mortero de porcelana también sumergido en hielo. Se le agregó 5 ml de Cl_3COOH al 5% bien frío, y se maceró con la mano del mortero para extraer todos los ésteres y desproteinizar el material.

Este macerado se filtró a través de un tubo de Barber y se recogió en probetas de 10 ml de capacidad, refrigeradas con hielo. Estas operaciones se realizaron lo más rápidamente posible y manteniendo todo a baja temperatura, para evitar la hidrólisis de la fosfocreatina.

De este líquido se tomaron 0,5 ml y sobre ellos se determinó el fósforo inorgánico, según el método de Lowry-Lopez. A 0,5 ml de muestra se le agregaron 6 ml buffer; 0,5 ml H_2O ; 1 ml sol. de Cu^{2+} ; 1 ml molibdato y 1 ml ácido ascórbico.

Se dejó desarrollar el color durante 5 minutos y luego se leyó en un colorímetro Grudo-Camacho con filtro 6.200 Å. Simultáneamente se llevó a cabo un control con una cantidad conocida de fósforo. Se obtuvo un valor de fósforo P_I .

El líquido sobrante se diluyó generalmente unas 2,5 veces con agua destilada y se dejó a temperatura ambiente 1 hora (Sol. A). Así se produce espontáneamente la hidrólisis de la fosfocreatina. Luego se tomó 1 ml de solución y se determinó fosfato nuevamente por el método de Fiske-Subbarow. A 1 ml de la muestra se agregaron 1 ml Cu^{2+} , 1 ml de molibdato, 6,6 ml de H_2O y 0,4 ANS. Se leyó a los 10 minutos.

Al valor obtenido (a) se le restó el de fósforo inorgánico determinado anteriormente.

De modo que $b - \text{P}_I = \text{P}_{\text{PC}}$

A otro ml de la solución A se le agregó 1 ml de ClH 1N y se

hidrolizó durante 10 minutos a baño maría. Luego se determinó fósforo (b); a este valor se le restó b. $C-b = P_{ATP}$. A otro ml de sol. A se le agregó 1 ml de CLH 1N y se hidrolizó 3 horas a 100°C. Se determinó luego fosfato y este valor representa el fósforo de los ésteres totales, P_T .

Determinación del glucógeno muscular.

Seguimos la técnica ya descripta para sacrificar al animal y pesar la muestra de unos 200 mg aproximadamente. Luego se la colocó en un tubo de centrifuga con 2 ml de KOH 30% y se calentó hasta disolver totalmente el material. Mientras estaba caliente se le agregó 2,2 ml de alcohol etílico y se dejó durante la noche.

Luego se centrifugó a 2.500 r.p.m. Se desechó el sobrenadante y se agregó 1,5 ml CLH 1N. Se hidrolizó 2 hs a 100°C. Se neutralizó con KOH y se llevó a 2 ml, agregando luego 4 ml de la solución alcalina de ferricianuro, se calentó 10 minutos a 100°C. Se enfrió y agregó 3 ml de la solución de ácido acético y 3 ml de la de $SO_4 Zn-IK$. Se agitó para eliminar el CO_2 y se dejó reposar. El precipitado de ferrocianuro de Zn es liviano y sube a la superficie. Sumergiendo una pipeta delgada hasta el fondo se obtuvo el líquido perfectamente límpido y se leyó en el colorímetro con filtro 5400 Å.

Determinación del título de líquido alantoideo infectado.

Se inculó por vía alantoidea un lote de embriones de pollo de 11 días con líquido alantoideo infectado con virus de influenza, cepa Formosa en dilución 10^{-3} . Se incubaron durante 24 hs. a 37°C, luego se mataron por enfriamiento a 4°C. Se les extrajo líquido alantoideo estérilmente y se los mezcló.

En diez tubos de hemólisis se colocaron: 1,9 ml de solución fisiológica en el primero y 1 ml en cada uno de los restantes. Al primero se le agregó 0,1 ml del líquido alantoideo,

se homogeneizó y de allí se pasó 1 ml al segundo tubo; de éste 1 ml al tercero y así sucesivamente. Del último tubo se eliminó 1 ml. En esta forma quedó 1 ml de sucesivas diluciones al medio del líquido alantoideo infectado desde 1:20 en el primer tubo hasta 1:10,240 en el último. A cada uno de ellos se le agregó 1 ml de una suspensión de glóbulos rojos de pollo standardizado.

Se hizo un tubo control que contenía 1 ml de solución fisiológica y 1 ml de suspensión glóbulos rojos. Se dejó reposar 1 hora; luego se observó el aspecto de los glóbulos rojos sedimentados. Los tubos donde aparecen aglutinados y los bordes del sedimento son irregulares se consideran positivos; aquellos donde el sedimento es igual al tubo control, se dan por negativos.

La mayor dilución de líquido alantoideo que produce aglutinación de los eritrocitos, es su título.

Preparación y titulación del antisuero específico contra cepa F.

Un conejo adulto se inoculó por vía intramuscular con 0,5 ml de líquido alantoideo infectado con virus de influenza cepa F adaptada a embrión, más 1 ml de adyuvante de Freund. Se lo sangró por punción cardíaca a los 15 días y se separó el suero. Luego se lo tituló de la siguiente manera.

Se inocularon en embriones de 11 días, diluciones sucesivas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} de líquido alantoideo infectado con cepa F con el suero obtenido. Luego de 24 hs. de incubación se mataron los embriones por enfriamiento, se les extrajo líquido alantoideo y con él se hizo una reacción de Hirst. Así se determinó cuál era la menor dilución de virus neutralizada por el suero.

Tratamiento estadístico

A los datos recopilados con los métodos anteriores se les aplicaron las fórmulas siguientes (113):

$$\text{Promedio} \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad n = \text{no datos}$$

Desviación standard

$$s = \frac{\sum \Delta^2}{n-1} \quad \Delta = x_1 - \bar{x}$$

Para determinar si las diferencias entre los datos de animales normales y los de inoculados eran significativos se aplicó el ensayo t", en el cual, para dos series de distintos números de datos, se usan las formulas:

$$s^2 = \frac{\sum x_1^2 - (\sum x_1)^2/n + \sum y_1^2 - (\sum y_1)^2/m}{(n-1) + (m-1)}$$

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s} \sqrt{\frac{n m}{n+m}}$$

Una vez obtenido el valor de t se va a una tabla. Si su valor es mayor que el dado para nuestro número de datos y para el por ciento de probabilidad de que la diferencia sea debida al azar, condición esta última, que se fija según el tipo de trabajo y que en problemas biológicos es 5, la diferencia obtenida es significativa. En nuestro caso t debe ser mayor que 2 para que la diferencia entre ambos promedios sea significativa.

RESULTADOS1. Ratones blancos normales.

Siguiendo métodos anteriores se obtuvieron los valores que se dan a continuación de fósforo inorgánico, fósforo de fosfo-creatina, de ATP y total.

Los valores expresan en mg de P por 100 g de músculo.

TABLA I

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
32.1	34.5	38.5	105.9
34.3	33.2	41.7	119.7
33.8	38.6	40.8	117.2
31.2	25.6	35.8	100.2
33.2	30.9	32.0	106.1
28.6	42.1	43.5	108.0
42.4	27.7	31.0	106.0
21.6	38.2	23.8	89.5
26.1	24.1	24.8	77.2
35.8	32.8	41.4	116.4
30.0	28.5	31.3	100.7
37.1	39.7	39.3	117.9
35.4	28.7	33.6	106.9
31.6	31.9	28.6	112.0
28.0	26.7	31.5	104.4
23.9	30.0	30.3	92.8
24.7	29.5	30.5	91.9
33.7	32.4	27.6	101.5
33.8	25.5	21.8	90.0
39.0	23.5	31.7	96.4
32.8	36.4	32.4	113.4
35.0	28.9	31.7	107.4

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
36.6	31.5	38.6	118.5
40.0	27.9	27.3	118.2
23.1	27.2	38.9	102.5
20.0	24.9	36.4	100.7
28.8	36.2	43.5	119.6
$\bar{x} = 31,6$	$\bar{x} = 31,0$	$\bar{x} = 33,3$	$\bar{x} = 105,7$
$s = 5,6$	$s = 4,9$	$s = 5,9$	$s = 9,8$
$P_I = 31,6 \pm 5,6$			
$P_P = 31,0 \pm 4,9$			
$P_{ATP} = 33,3 \pm 5,9$			
$P_T = 105,7 \pm 9,8$			

2. Ratones inoculados con virus de influenza cepa F.

Un lote de ratones blancos adultos se inoculó intraperitonealmente con 0,2 ml de líquido alantoideo infectado con virus de influenza tipo A cepa Formosa cuyo título era de 1:1280. Los animales se sacrificaron a las 24, 48 y 72 hs. luego de su inoculación; los valores obtenidos se dan en las tablas II, III y IV.

TABLA II

Ratones inoculados con cepa F. sacrificados 24 horas después.

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
21,3	32,0	22,8	92,9
37,6	28,6	21,8	97,8
25,2	28,7	22,5	81,0
32,7	26,5	25,4	89,3
25,2	26,0	20,0	86,3

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
30,6	19,4	18,9	82,8
29,5	32,7	19,0	93,9
31,3	26,0	24,8	91,3
35,1	21,5	17,4	85,0
36,0	29,1	28,8	95,2
36,8	27,8	18,4	83,8
31,0	23,1	21,9	100,2
34,2	26,8	19,4	83,3
36,1	27,2	23,6	86,7
$\bar{x} = 31,6$	$\bar{x} = 26,8$	$\bar{x} = 22,3$	$\bar{x} = 89,2$
$s = 4,9$	$s = 3,6$	$s = 3,1$	$s = 6,0$

$$\begin{array}{ll}
 P_I = 31,6 \pm 4,9 & t = 0 \\
 P_P = 26,8 \pm 3,6 & t = 2,4 \\
 P_{ATP} = 22,3 \pm 3,1 & t = 7,1 \\
 P_T = 89,2 \pm 6,0 & t = 3,7
 \end{array}$$

—0—

PABLA IIIRatones inculados con cepa F. sacrificados 48 horas despues.

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
19,0	20,0	23,7	75,7
18,9	25,1	21,4	78,8
33,0	27,0	23,2	87,3
26,7	25,2	19,3	75,7
21,8	20,2	20,6	77,6
28,2	21,2	23,1	80,1
28,3	19,6	21,1	92,9
31,6	27,7	20,9	90,8
36,2	26,1	25,9	96,5

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
25,6	29,3	21,0	95,3
34,1	26,1	29,8	102,6
29,9	30,2	23,3	96,6
34,1	22,9	23,7	100,0
$\bar{x} = 28,2$	$\bar{x} = 24,6$	$\bar{x} = 22,8$	$\bar{x} = 88,3$
$s = 5,7$	$s = 3,6$	$s = 2,8$	$s = 9,6$
$P_I = 28,2 \pm 5,7$		$t = 1,71$	
$P_P = 24,6 \pm 3,6$		$t = 3,6$	
$P_{ATP} = 22,8 \pm 2,8$		$t = 17,5$	
$P_T = 88,3 \pm 9,6$		$t = 4,5$	

—0—

TABLA IVRatones inculados con cepa P. sacrificados 72 horas después.

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
31,8	21,7	27,2	93,1
29,7	21,9	22,3	76,0
30,3	24,8	29,0	85,0
28,7	17,1	29,2	76,0
20,2	25,2	22,2	80,3
23,2	14,1	20,8	73,2
25,0	18,6	20,5	73,0
29,4	22,9	23,3	91,1
32,1	15,2	24,6	81,1
24,8	16,1	27,8	81,9
33,4	23,0	17,5	92,0
33,8	22,6	19,1	86,4
33,2	17,7	21,4	96,5

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
34,6	26,2	22,8	83,6
30,8	26,5	22,0	94,3
$\bar{x} = 29,4$	$\bar{x} = 20,9$	$\bar{x} = 24,4$	$\bar{x} = 83,8$
$s = 4,2$	$s = 4,1$	$s = 3,6$	$s = 7,8$

$$P_I = 29,4 \pm 4,2 \quad t = 1,20$$

$$P_F = 20,9 \pm 4,1 \quad t = 16,87$$

$$P_{ATP} = 24,4 \pm 3,6 \quad t = 4,96$$

$$P_T = 83,8 \pm 7,8 \quad t = 5,5$$

3. Ratones inoculados con líquido alantoideo normal.

Un lote de ratones blancos adultos se inoculó con líquido alantoideo de embriones normales de 11 días de incubación. Los animales se sacrificaron a las 24, 48 y 72 hs. luego de su inoculación. Los resultados obtenidos se dan en las tablas V, VI y VII.

TABLA V

Ratones inoculados con líquido alantoideo normal sacrificados 24 horas después.

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
20,0	32,3	29,6	97,7
24,2	29,0	29,5	95,3
37,2	36,0	27,5	107,4
47,9	31,4	27,0	113,1
40,1	31,6	29,1	103,6
29,3	27,3	25,6	90,0
33,8	33,3	28,9	107,9
35,3	26,8	34,1	109,2
20,0	30,8	29,0	86,0

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
30,3	27,0	25,5	101,2
33,1	34,3	38,9	111,0
20,0	20,4	30,4	92,6
$\bar{x} = 30,9$	$\bar{x} = 30,8$	$\bar{x} = 29,6$	$\bar{x} = 101,2$
$s = 8,9$	$s = 4,3$	$s = 3,7$	$s = 8,8$

$$P_I = 30,9 \pm 8,9 \quad t = 0,29$$

$$P_P = 30,8 \pm 4,3 \quad t = 0,24$$

$$P_{ATP} = 29,6 \pm 3,7 \quad t = 1,9$$

$$P_T = 101,2 \pm 8,8 \quad t = 1,8$$

—0—

TABLA VI

Ratones inoculados con líquido alantóideo normal, sacrificados
48 horas después.

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
25,4	28,3	29,6	100,0
24,7	41,2	39,3	102,2
29,9	32,6	34,3	105,6
31,1	38,4	32,5	99,4
30,2	36,6	33,8	114,5
35,5	40,8	26,7	117,7
32,1	29,0	31,0	111,6
37,6	43,8	33,0	107,4
28,0	44,8	25,0	115,7
26,7	45,5	29,7	112,8
36,9	40,5	31,5	122,7
31,7	31,9	25,4	103,2
31,1	28,4	33,1	124,2

$$\begin{array}{llll} \bar{x} = 30,8 & \bar{x} = 37,0 & \bar{x} = 31,9 & \bar{x} = 111,1 \\ s = 4,0 & s = 6,4 & s = 4,0 & s = 8,5 \end{array}$$

$$P_I = 30,8 \pm 4,0 \quad t = 0,49$$

$$P_P = 37,6 \pm 6,4 \quad t = 2,50$$

$$P_{ATP} = 31,9 \pm 4,0 \quad t = 0,75$$

$$P_T = 111,1 \pm 8,5 \quad t = 1,3$$

—○—

TABLA VII

Ratones inoculados con líquido alantoideo normal, sacrificados
72 horas después.

P INORGANICO	P POSTOCREATINA	P ATP	P TOTAL
29,0	39,6	33,0	106,6
32,7	26,0	32,5	97,0
23,4	34,9	31,7	101,0
25,9	33,5	26,0	96,5
24,2	34,1	30,9	100,0
25,6	24,1	36,3	95,9
24,9	30,2	27,5	100,0
27,7	39,1	24,1	103,2
34,3	42,3	33,5	104,4
39,7	37,5	29,7	114,6
35,9	35,8	31,9	102,9
43,0	36,1	24,3	106,2
36,0	34,4	29,8	102,9
42,4	38,9	26,6	121,4
$\bar{x} = 31,7$	$\bar{x} = 34,7$	$\bar{x} = 29,8$	$\bar{x} = 104,4$
$s = 6,3$	$s = 5,1$	$s = 3,7$	$s = 7,0$

$$P_I = 31,7 \pm 6,3 \quad t = 0,03$$

$$P_F = 34,7 \pm 5,1 \quad t = 2,0$$

$$P_{ATP} = 29,8 \pm 3,7 \quad t = 1,9$$

$$P_T = 104,4 \pm 7,0 \quad t = 0,3$$

4. Ratones blancos inoculados con virus y antisuero.

Se inoculó un lote de ratones blancos con 0,2 ml de una mezcla de virus cepa F y el antisuero específico, que lo neutralizaba totalmente. Esta mezcla fue inoculada por vía alantoidea en embriones de pollo de 11 días, que se sacrificaron luego de 24 hs. y se les extrajo el líquido alantoideo, haciéndose una reacción de hemoaglutinación que dio negativa.

Los animales se sacrificaron luego de 48 horas y se determinó fósforo inorgánico, de fosfocreatina, de ATP y total.

TABLA VIII

Ratones inoculados con F y antisuero específico sacrificados
48 hs. después

P INORGANICO	P FOSFOCREATINA	P ATP	P TOTAL
33,2	24,9	18,5	97,5
34,2	29,5	15,6	86,9
36,5	32,4	15,9	101,0
33,6	15,4	30,6	103,9
39,2	19,1	26,0	97,3
39,5	20,0	35,6	100,4
42,6	14,4	23,0	103,5
35,0	17,0	21,7	93,4
31,9	15,7	33,8	80,6
29,7	16,2	19,3	97,7
30,3	19,0	32,2	92,2
$\bar{x} = 35,2$	$\bar{x} = 20,3$	$\bar{x} = 24,7$	$\bar{x} = 95,8$
$s = 4,1$	$s = 6,1$	$s = 7,3$	$s = 7,2$

$$P_I = 35,2 \pm 4,1 \quad t = 1,68$$

$$P_F = 20,3 \pm 6,1 \quad t = 4,58$$

$$P_{ATP} = 24,7 \pm 7,3 \quad t = 3,64$$

$$P_T = 95,8 \pm 7,2 \quad t = 1,40$$

—0—

En el cuadro siguiente se resumen los resultados anteriores.-

Hs.	P. INORGANICO			P. DE FOSFOCREATINA			P. DE ATP			P. TOTAL		
	N	LAN	F	N	LAN	F	N	LAN	F	N	LAN	F
24		30,9	31,6		30,9	28,8		29,6	22,3		101,2	89,2
48	31,6	30,0	28,2	31,0	37,6	24,6	33,3	31,9	22,8	105,7	111,1	88,3
72		31,7	29,4		24,7	20,0		29,8	24,4		104,4	83,8

5. Determinación de glucógeno.-

Se inoculó un lote de ratones blancos con 0,2 ml de líquido alantoideo infectado con cepa Formosa, cuyo título era de 1:1280, hallado por hemoaglutinación. Otro lote de ratones fué inoculado con 0,2 ml líquido alantoideo normal de embriones con 11 días de incubación. En ambos lotes se determina glucógeno según el método descrito anteriormente. Los animales fueron sacrificados 48, 72, 96, 120 y 144 horas luego de inoculados.

TABLA IX

Hs.	48		72		96		120		144	
	N	F	LAN	F	LAN	F	LAN	F	LAN	F
245	240	303	200	285	330	337	296	256	475	240
485	380	290	240	245	250	335	305	240	240	215
290	300	400	275	490	340	226	230	244	410	295
340	220	320	269	217	295	242	226	250	246	450
231			330	410	372	368	285	270	230	230

///

Ns	48		72		96		120		144	
	F	LAN	F	LAN	F	LAN	F	LAN	F	LAN
432			300	227	320	300	270	330		
230			430	345	170	400	295	235		
408			239	373	253	163	260	225		
454			219	350	248	215	220	230		
220			250	385						
366			257	200						
440			400	333						
411										
300										

6. Determinación de infectividad en músculo.

Se inoculó un lote de ratones con líquido alantoideo infectado con cepa Formosa, con título 1:1280. Los animales se sacrificaron luego de 24, 48, 72, 96 y 120 hs., se les extrajo un trozo de músculo que se maceró en mortero estéril con arena y se suspendió al 10% en caldo con 500 U. de penicilina y 50 de estreptomicina. Se centrifugó para separar las partículas más gruesas y el sobrenadante se inoculó en distintas diluciones en embriones de 11 días por vía alantoidea. Al cabo de 24 hs se matan los embriones por enfriamiento y se busca la presencia de virus en líquido alantoideo mediante la reacción de Hirut.

TABLA X

DILUCION	HORAS	24	48	72	96	120
	10^{-1}		-	-	-	-
10^{-2}		-	-	-	-	-
10^{-3}		-	-	-	-	-
10^{-4}		-	-	-	-	-
10^{-5}		-	-	-	-	-

DISCUSION

El virus de influenza provoca cambios metabólicos en los huéspedes en los cuales desarrolla. En huevos de gallina embrionados se han encontrado variaciones en el volumen del líquido alantoideo, de su pH, del peso de la membrana corioalantoidea y de la glicólisis anaerobia de la membrana corioalantoidea.

Una de las alteraciones más importantes es la detención de su desarrollo, fenómeno que se ha relacionado con el metabolismo del fósforo y su ésteres, especialmente de la fosfocreatina y del ATP, Pappalardo (101) encuentra un aumento en la cantidad total de creatinina y creatina en el líquido alantoideo de embriones infectados, Parodi (100) observa una notable disminución de la fosfocreatina en los embriones infectados que comienza a las 4 hs. , se acentúa a las 7 hs. y vuelve a sus valores normales a las 24 hs. También se observa un descenso del fósforo inorgánico y del fósforo ácido soluble total.

En este trabajo se trató de observar si existían alteraciones similares en ratones infectados intraperitonealmente con el virus de influenza.

Se ha encontrado un descenso del fósforo proveniente de la fosfocreatina y del ATP, así como del fósforo ácido soluble total.

Los valores hallados en ratones inoculados con líquido alantoideo normal no muestran variaciones con respecto a los normales, salvo en un caso (a las 48 hs. el fósforo del ATP aumenta) al cual no le atribuimos significado.

Las determinaciones de virus infeccioso en el músculo del animal infectado han dado resultado negativo; tampoco se ha encontrado variación en los valores del glucógeno muscular, aunque estos oscilan, en todos los casos, dentro de límites muy amplios.

Siendo la fosfocreatina la fuente de fosfatos para la síntesis del ATP una disminución en los valores de ambos hace pensar en la inhibición del proceso de síntesis de la primera que se reflejaría también en los valores del segundo.

Un efecto análogo se encuentra en los músculos "envenenados" con icdoacetato en los cuales desaparece la fosfocreatina, aunque se encuentra un aumento del fósforo inorgánico y de la creatina. Este efecto se atribuye a la inhibición de la gliceraldehído-3 fosfato dehidrogenasa y al bloqueo de la resíntesis del ATP a partir del ADP.

Dado que en el músculo no se encuentra virus infeccioso, se puede pensar que éste ejerce una acción tóxica que se manifiesta de esta manera. Dicha acción podría deberse a la partícula en sí o bien a alguna subunidad derivada de ella. Es conocida la toxicidad que tiene el virus de influenza. Hasta hace poco se pensaba que dicha toxicidad se debía a la partícula completa, pero en un reciente trabajo Lato y Okada (114) han desintegrado el virus de influenza por ultrasonido y han encontrado que a pesar de la pérdida de infectividad la toxicidad no disminuye y en algunos casos aumenta. Sugieren que la acción tóxica se debería a una proteína o lipo-proteína fuertemente adherida a la hemaglutinina, aunque parte de ella permanece unida al antígeno s.

De todas maneras, las experiencias anteriores indican que la acción tóxica es neutralizada por el antisuero específico.

Una observación semejante de acción tóxica que provoca un descenso de la fosfocreatina es el hallado por Pinchet y Bloor (115) al inocular toxina diftérica en ratas por vía subcutánea.

En cambio en este trabajo no se consiguió neutralizar el descenso del fósforo por la inyección simultánea del virus y del antisuero neutralizante, salvo en el caso del fósforo total.

Esto se podría explicar si el descenso del fósforo se debiera a subunidades derivadas de la partícula viral y contra las cuales no hubiera anticuerpos en el conejo, a pesar de que el virus se descompone en unidades menores al infectar las células o tejidos.

Por otra parte se debe tener en cuenta una posible acción debida al interferon. Se sabe que las células normales a las cuales se les inocula interferon aumentan su consumo de O_2 así como su producción de ac. láctico; pero el proceso de glicólisis queda desconectado de la producción de ATP, pensándose que la falta de este último es un factor importante en la acción del interferon frente a los virus, dado que ellos precisan del ATP para sus procesos sintéticos (116). Podemos pensar entonces que nuestros descensos de ATP y fosfocreatina pueden ser causados por la acción del interferon que fabricaría el animal al ser inoculado o por su presencia en el líquido alantoideo infectante.

CONCLUSIONES

- 1.- Se hicieron determinaciones del fósforo inorgánico y del de fosfocreatina, AMP y ácido soluble total en ratones blancos inoculados con virus de influenza y en ratones controles inoculados con líquido alantoideo normal.
- 2.- Se observó un descenso significativo en la fosfocreatina, ATP y fósforo total.
- 3.- Se discuten los resultados obtenidos y se propone su interpretación.

Lucía Belykiewicz
Mam

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Rivers, T.M., y Horsfall, F.L. Jr. Editores. "Viral and Rickettsial Infections of Man". 1959.
- 2 - Smith, W.; Andrewes, C.H. y Laidlaw, P.P.; Lancet. 2,66 (1933)
- 3 - Francis, T., Science. 92, 405 (1940).
- 4 - Francis, T., Quilligan, J.J. y Minuse, E., Science, 112, 495 (1952)
- 5 - Jensen, K.E., Minuse, E. y Ackermann, W.W., J.Immunol., 75, 71 (1955)
- 6 - Eldford, W.J.; Andrewes, C.H. y Tang, F.P., Brit.J.Exper.Path., 17, 51 (1936).
- 7 - Friedewald, W.F. y Pickels, E.G., J.Exp.Med., 79, 301 (1944).
- 8 - Hotz, G. y Schöfer, W.Z., Naturforsch, 10, 1 (1955).
- 9 - Morgan, C., Rose, H.M. y Moore, D.H., J.Exp.Med., 104, 171 (1956)
- 10 - Birch-Andersen, A., y Paucker, K., Virology, 8, 21 (1959)
- 11 - Chu, C.M., Dawson, I.M. y Eldford, W.J., Lancet, 1, 602 (1949)
- 12 - Burke, D.C., Isaacs, A. y Walker, J., Biochim. et Biophys Acta, 26, 576 (1957).
- 13 - Valentine, R.C. e Isaacs, A., J.Gen.Microbiol., 16, 195 (1957).
- 14 - Donald, H.B. e Isaacs, A., J.Gen.Microbiol., 11, 325 (1954).
- 15 - Ada, G.L. y Perry, B.T., Nature, 175, 209 (1955).
- 16 - Ada, G.L., "The Nature of Viruses", 104, Ciba Foundation Symposium (1957).
- 17 - Ada, G.L., Perry, B.T. y Abbot, A., J.Gen.Microbiol., 19, 23 (1958).
- 18 - Ada, G.L., Perry, B.T., J.Gen.Microbiol., 19, 40 (1958).
- 19 - Kilbourne, E.D. y Murphy, J.S., J.Exp.Med., 111, 387 (1960).
- 20 - Hoyle, L., J.Hyg., 50, 229 (1952).
- 21 - Hoyle, L., Reed, R. y Astbury, W.T., Nature, 171, 256 (1953).
- 22 - Davenport, F., Rott, R. y Schäffer, W., J.Exp. Med., 112, 765 (1960).
- 23 - Paucker, K., Birch-Andersen, A. y von Magnus, P., Virology, 8, 1 (1959).
- 24 - Rose, H.M. y Morgan, C., Ann. Rev. of Microbiol., 14, 217 (1960)
- 25 - Fronhagen, L.H. y Knight, C.A., Virology, 2, 430 (1956)

- 26 - Hirst, G.K., *Science*, 94, 22 (1941).
- 27 - McClelland, L. y Hare, R., *Canad.J.Pub.Health*, 32, 530 (1941)
- 28 - Hirst, G.K., *J.Exp.Med.*, 75, 49 (1942).
- 29 - Hirst, G.K., *J.Exp.Med.*, 76, 195 (1942).
- 30 - Fazekas de St.Groth, S. y Cairns, H. J.F., *J.Immunol.*, 69, 133 (1952).
- 31 - Miller, G.L. y Stanley, W.M., *J.Exp.Med.*, 79, 185 (1944).
- 32 - Lowell, F.C. y Buckingham, M., *J.Immunol.*, 58, 229 (1948) (Cit. por Anderson, S.G. en "The Viruses", 1959).
- 33 - Davenport, F.M. y Horsfall, F.L.Jr., *J.Exp.Med.*, 88, 621 (1948)
- 34 - Burnet, F.M. y Edney, M., *Australian J.Exp.Biol. Med.Sci.*, 30, 105 (1952).
- 35 - Edney, M., *Australian J.Exp.Biol.Med.Sci.*, 27, 253 (1949)
- 36 - Burnet, F.M. y Bull, D.R., *Australian J.Exp.Biol.Med. Sci.*, 25, 55 (1943).
- 37 - Henle, W. y Henle, G., *J.Exp.Med.*, 85, 347 (1947).
- 38 - Burnet, F.M., *J.Gen.Microbiol.*, 5, 46 (1951).
- 39 - Fazekas de St.Groth, S. y Graham, D.M., *Australian J.Exp. Biol. Med. Sci.*, 27, 83 (1949).(Cit.por Henle, W., *Adv.Virus Research*, 1953).
- 40 - Stone, J.D., *Australian J.Exp.Biol.Med.Sci.*, 27,229 (1949).(Cit. por Henle, W., *Adv.Virus Research*, 1953).
- 41 - Tyrrell, D.A. y Horsfall, F.L., Jr., *J.Exp.Med.*, 99,231 (1954).
- 42 - Burnet, F.M. y Stone, J.D., *Australian J.Exp.Biol. Med.Sci.*, 23, 147 (1945).
- 43 - Hirst, G.K., *J.Exp.Med.*, 87, 315 (1948).
- 44 - Burnet, F.M. y Stone, J.D., *Australian J.Exp.Biol.Med.Sci.*, 25, 227 (1947).
- 45 - Burnet, F.M., *Australian J.Exp.Biol.Med.Sci.*, 27, 217 (1949). (Cit. por Anderson, S.G., *The Viruses*, 1959).
- 46 - Briody, B.A., *J.Immunol.*, 59, 115 (1948). (Cit. Anderson, S.G., *The Viruses*, 1959).
- 47 - Stone, J.D., *Australian J.Exp.Biol.Med.Sci.*,26, 49 (1948).

- 48 - Stone, J.D., Australian J.Exp.Biol.Med.Sci., 26, 287 (1948).
- 49 - Merchant, D.J. y Morgan, H.R., Proc.Soc.Exp.Biol.and Med., 74, 651 (1950).
- 50 - Ginsberg, H.S., Blackmon, J.R., Virology, 2, 618 (1956).
- 51 - Fisher, T.N., Ginsberg, H.S., Virology, 2, 637 (1956).
- 52 - Fisher, T.N., Ginsberg, H.S., Virology, 2, 656 (1956).
- 53 - Francis, T., Jr., J.Exp.Med., 85, 1 (1947).
- 54 - Anderson, S.G., Australian J.Exp.Biol.Med.Sci., 26, 347 (1948).
- 55 - McCrea, J.F., Australian J.Exp.Biol.Med.Sci., 26, 355 (1948).
- 56 - Stone, J.D., Australian J.Exp.Biol.Med.Sci., 27, 337 (1949).
(Cit. por Henle, W., Adv.Virus Research, 1953).
- 57 - Smith, W. y Westwood, J.C.H., Brit. J.Exp.Path., 31, 725 (1950)
- 58 - Tamm, I. y Horsfall, F.L., Jr., J.Exp.Med., 95, 71 (1952).
- 59 - Perlmann, G.E., Tamm, I. y Horsfall, F.L., Jr., J.Exp.Med., 95, 99 (1952).
- 60 - Francis, T., Jr. y Minuse, E., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 69, 291 (1948).
- 61 - Saltsan, J.H., Lami, F. y Beard, J.W., J.Immunol., 63, 261 (1949).
- 62 - Gottschalk, A. y Lind, P.E., Brit.J.Exp.Path., 30, 85 (1949).
- 63 - Cohen, A. y Belyaev, G., Virology, 7, 59 (1959).
- 64 - Burnet, F.M. y McCrea, J.F., Australian J.Exp.Biol.Med.Sci., 24, 277 (1946)
- 65 - McCrea, J.F., Australian J.Exp.Biol.Med.Sci., 24, 283 (1946).
- 66 - Ananthanarayan, B.A. y Jayaram Panicker, C.K., Bull.Wed.Heth. Org., 22, 409 (1960)
- 67 - Spence, J., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 103, 425 (1960)
- 68 - Gottschalk, A., Nature, 170, 662 (1952)
- 69 - Gottschalk, A., Biochim. et Biophys. Acta, 20, 560 (1956)
- 70 - Gottschalk, A., Biochim. et Biophys. Acta, 23, 645 (1957)
- 71 - Gottschalk, A., The Viruses, Vol.3, Academic Press, New York and London (1959).
- 72 - Stone, J.D., Australian J.Exp.Biol.Med.Sci., 27, 557 (1949)
(Cit. por Anderson, S.G., The Viruses, 1959)

- 73 - Burnet, F.H., *Australian J.Exp.Biol.Med.Sci.*, 27,361 (1949)
(Cit.por Anderson, S.G, *The Viruses*, 1959).
- 74 - Andrewes, C.H., Laidlaw, P.P. y Smith, W., *Lancet*, 2,859(1934)
- 75 - Francis, T.Jr., *Science*, 80,457 (1934).
- 76 - Rickard, E.R. y Francis, T.Jr., *J.Exp.Med.*, 67, 953 (1938).
- 77 - Stuart-Harris, C.H., *Lancet*, 1, 497 (1939).
- 78 - Francis, T. Jr., y Moore, A.E., *J.Exp.Med.*, 72, 717 (1940).
- 79 - Burnet, F.H., *Australian J.Exp.Biol.Med.Sci.*, 18, 353 (1940).
- 80 - von Magnus, P., *Acta Pathol.Microbiol.Scand.*, 28, 278 (1951).
- 81 - Bernkopf, H.J., *Immunol.*, 65, 571 (1950).
- 82 - Francis, T., Jr. y Magill, T.P., *Science*, 82, 353 (1935).
- 83 - Ackermann, W.W., *J.Biol.Chem.*, 189, 421 (1951).
- 84 - Ackermann, W.W., y Maassab, H.F., *J.Exp.Med.*, 99, 105 (1954).
- 85 - Bang, (1958) citado por Rivers (1).
- 86 - Bang, F.B. y Geij, G.O., *Trans.N.Y. Acad.Sci.*, 13, 324 (1951)
- 87 - Tyrrell, D.A.J., *J.Immunol.*, 74, 293 (1955).
- 88 - Henle, G. y Henle, H., *J.Exp.Med.*, 84, 623 (1946).
- 89 - Henle, W. y Henle, G., *J.Exp.Med.*, 84, 639 (1946).
- 90 - Salk, J.E., *J.Immunol.*, 53, 359 (1948).
- 91 - Dogoch, S., Lynch, P. y Levine, A.S., *Virology*, 7,161 (1958).
- 92 - Cairns, H.J.F., Fazekas de St.Groth, S., *J.Immunol.*, 78, 191 (1952).
- 93 - Hoyle, L. y Frisch-Niggemeyer, W., *J.Hyg.*, 53, 474 (1955).
- 94 - Henle, W. y Henle, G., *J.Exp.Med.*, 90, 23 (1949).
- 95 - Isaacs, A. y Edney, M., *Australian J.Exp.Biol.Med.Sci.*, 28, 635 (1950).
- 96 - Watson, E.K., Coons, A.H., *J.Exp.Med.*, 99,419 (1954).
- 97 - Breitenfeld, P.K. y Schäfer, W., *Virology*, 4, 328 (1957).
- 98 - Traver, M.I., Northrop, R.L. y Walker, D.L., *Proc.Soc.Exp. Biol.Med.*, 104, 268 (1960).
- 99 - Parodi, A.S., Lajmanovich, S., Peninpede, F., Mittelman, N., *J.Immunol.*, 58, 109 (1948).
- 100 - Parodi, A.S., *Archiv.Biochem.*, 22, 324 (1949).
- 101 - Pappalardo, H.H., *Rev.Inst.Bac.Malbrán*, 14, 16 (1949)

- 102 - Kalter, S.S., *J.Immunol.*, 6,499 (1950).
- 103 - Ambruster, O. y Buss, H., *Z.Naturforsch B.Dtsch.*, 13, 75 (1958)
- 104 - Lenti, G., Tortarolo, E. y Pellegrini, A., *Boll.Ist.Seroterap. Milán*, 36, 11, 644 (1957).
- 105 - Wielgosz, G.S., *Virology*, 3, 475 (1957).
- 106 - Parodi, A.S., Lajmanovich, S., *Rev.Soc.Arg.Biol.*, 23, 310 (1947).
- 107 - Faucomier, B., *Ann.Inst.Pasteur*, 85, 222 (1953).
- 108 - Rafelson, M.E.Jr., *Arch.Biochem.and Biophys*, 90, 68 (1957).
- 109 - Fiske, C.H., Subbarow, Y., *J.Biol.Chem.*, 66, 375 (1925).
- 110 - Lowry, O.H. y Lopez, J.A., *J.Biol.Chem.*, 162, 421 (1946).
- 111 - Delsal, J.L. y Manhourri, H., *Bull.Soc.Chin.Biol.*, 40, 1169 (1958).
- 112 - Valverde, E., *An.As.Quim.Arg.*, 47, 135 (1959).
- 113 - Youden, W.J., *Statistical Methods for Chemists*, John Wiley and Sons, Inc. 1951.
- 114 - Kato, H. y Okada, A., *Brit.J.Exp.Path.*, 42, 253 (1961).
- 115 - Pinchet, G.B. y Bloor, W.L., *J.Biol.Chem.*, 9, 184 (1950).
- 116 - Isaacs, A., *Virology*, 10, 144 (1960).