

Análisis de los líquidos extraembrionarios de huevos de gallina normales e inoculados con virus "A" de influenza

Por M. H. PAPPALARDO

Un gran número de procesos patológicos aparecen asociados a alteraciones celulares de carácter químico o físicoquímico bien definidas. El estudio detallado de estas alteraciones constituye sin duda alguna, al margen de su valor diagnóstico, una de las fuentes de información más fecunda acerca de las modificaciones metabólicas que caracterizan al proceso en estudio.

En el terreno de las enfermedades a virus, el conocimiento de las alteraciones metabólicas producidas por la infección está poco menos que en sus comienzos, orientándose en general al estudio de la influenza que la presencia del virus parece tener sobre ciertos procesos enzimáticos. (Raker y Krinsky; Utter, Reiner y Wood).

En el caso particular de la infección experimental del embrión de pollo por el virus de influenza, ciertas observaciones realizadas en los últimos años (Berkeley, 1945; Parodi, Lajmanovich, Pennimpede y Mittelman, 1947; Pennimpede, 1948) indicarían la existencia de variaciones consistentes en el pH y volumen de los líquidos alantoideos de embriones normales e infectados, como así también en el peso de los mismos. El sentido de esa variación es el de un aumento en el pH y volumen de los alantoideos correspondientes a embriones infectados y a una disminución en el peso de éstos. Se observa además en los embriones infectados dificultades en el metabolismo gaseoso.

Tomando como punto de partida las diferencias indicadas, nos hemos propuesto el estudio comparativo y sistemático de las modificaciones químicas que el desarrollo del virus de influenza origina en el líquido alantoideo del embrión de pollo.

Este planteo sencillo y concreto tiene por el momento que circunscribirse en el presente trabajo al estudio comparativo de la distribución de nitrógeno, debido a una suma de obstáculos, fundamentalmente:

1) La falta de antecedentes bibliográficos consistentes, que nos obligó a encarar el problema de raíz.*

* No podemos dejar de mencionar aquí la inestimable ayuda que en ese sentido significó para nosotros la Chemical Embriology de Needham.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 16 de diciembre de 1947.

2) La falta de métodos analíticos aplicables con seguridad al tipo de líquidos con que operábamos.

3) Las dificultades en la obtención de una muestra representativa.

a) La elevada mortalidad de algunas tandas de huevos, que llegaba a veces al 100 %.

b) La imposibilidad de controlar el origen de los huevos, que obligó a descartar series enteras de datos, cuando se advertía claramente en la última semana de incubación que se trataba de embriones de desarrollo anormal, posiblemente infectados (*salmonella pullorum*).

5) La elevada variación de los datos, que obligaba a realizar un gran número de determinaciones para obtener valores representativos.

Nos proponemos completar posteriormente este análisis; disponemos al efecto de la puesta a punto de varios métodos cuya realización experimental no fué posible.*

El plan, que referimos a los líquidos embrionarios por haber sido parcialmente extendido al amniótico, es el siguiente:

ANÁLISIS DE LOS LÍQUIDOS EXTRAEMBRIONARIOS DE HUEVOS DE GALLINA NORMALES E INOCULADOS CON VIRUS DE INFLUENZA

Estudio bibliográfico, crítica de los trabajos existentes.

Puesta a punto de un método para la obtención de la muestra.

Puesta a punto de métodos para dosar nitrógeno y su distribución.

Análisis.

En el desarrollo de ese plan, presentamos la tesis dividida en dos partes.

I — Preparación de los huevos.

Obtención de la muestra.

II — Análisis.

Conclusiones.

PRIMERA PARTE

Se trabajó con huevos Leghorn, preferentemente en los meses de abril a noviembre. La mortalidad y la proporción de estériles aumentan mucho en los restantes.

* Alantoína (Young, McPherson, Wentworth and Hawkins), Glucosa (Hagerdon and Jensen), fósforo (Fiske y Subbarow), Aminoácidos (Folin (1)), Anhídrido carbónico (Van Slyke y Neill), y ácido láctico (Friedeman, Cottonio and Shaffer).

Las primeras operaciones son las de rutina en el cultivo de virus * en huevo; se los incuba a 37°8 C durante once días, se descartan por observación al ovoscopio los muertos o estériles, y se procede a las operaciones de inoculación. Juntamente con la observación se procede a marcar frente al ovoscopio una zona de la cáscara que corresponda a un lugar de la membrana alantoidea libre de grandes vasos. Sobre la cámara de aire se hace otra que indica la situación de la primera y permite que la inoculación se haga con un manoseo mínimo del huevo. En la técnica de cultivo se marca además el perímetro de la cámara de aire.

Nosotros preferíamos hacerlo posteriormente, al retirar cada lote para su análisis.

Como nuestro trabajo era esencialmente comparativo, antes de inocular los huevos se procedía a distribuirlos y numerarlos en cuatro grupos según su peso: 1) menos de cincuenta gramos; 2) entre cincuenta y cincuenta y cinco gramos; 3) entre cincuenta y cinco y sesenta gramos; 4) más de sesenta gramos. La mayoría corresponde generalmente a huevos de los grupos 2 y 3, pero a veces se operó con tandas en que predominaban los del primer grupo. Los del 4° no pasaban del 5 al 10 %. Los trabajos de Axelsson y de Godfrey indican, que el mínimo de mortalidad (20-30 %) en la incubación, se logra con huevos de los grupos 2 y 3.

Los grupos de huevos se dividían entre normales e infectados, y los lotes extraídos a distintos días, correspondían aproximadamente en su composición, a la general de la tanda.

La comparación posterior de los datos hizo ver que, excepto para los huevos del grupo 4, en que predominan volúmenes altos, no hay relación directa entre el tamaño (tamaño y peso, con raras excepciones, son directamente proporcionales) y el volumen de alantoideo o su composición química, al menos en los datos determinados. Las variaciones en el peso son fundamentalmente debidas al peso de la clara (Penionskevitch).

Los huevos, una vez pesados, eran lavados con un algodón mojado con solución al 20 % de hexilresorcinol. Esta operación era particularmente útil para nosotros cuando usábamos el vuelco directo como método de extracción del alantoideo.

Tras dejarlos un tiempo en la incubadora para evitar toda posible traumatización por enfriamiento, se procedía a cortar la cáscara con un torno sobre las marcas hechas sobre el saco alantoideo y la cámara de aire, cuidando de no romper la fáfara. (La correspondiente a la cámara de aire era rota, luego, con una lanceta esterilizada). Se lavaban luego con alcohol y se inoculaban en el alantoideo tapan-

* Desde ya nos referiremos siempre al virus A de influenza.

do inmediatamente ese orificio con parafina. Se procedía a incubar a 35° C; los huevos se daban vuelta diariamente.

Se inoculaba 0.1 cc. de una dilución 10^{-5} de virus A de influenza, cepa 7, aislada en el país (Sordelli, Taylor y Parodi), título 1/1024, (aglutinación de glóbulos rojos de pollo, técnica de Hirst). Los huevos que llamamos normales eran inoculados con 0.1 cc. del diluyente. La dilución se hacía con caldo penicilinado en los casos en los que no se determinaba nitrógeno. (El contenido en nitrógeno de ese caldo es de 5 mg. por cc.). En los otros casos se utilizaba suero fisiológico.

Hasta dónde pueden llamarse normales los huevos inoculados con soluciones estériles, es cuestión que requeriría de por sí un trabajo comparativo. En lo que respecta a la distribución en peso de las distintas partes del huevo, son idénticos a los normales (Pennimpe, experiencias hechas sobre el peso de embriones). Además, nuestros datos sobre huevos normales son sólo relativamente comparables con los hallados por otros autores, debido a la diferencia en la temperatura de incubación.

Pasadas las horas deseadas de incubación, se verificaba si estaban vivos, se ponían una hora a -15° C y luego a 4° C hasta que se analizaban.

Los detalles para la toma de muestras se dan más adelante. Los huevos se lavaban nuevamente, con agua destilada esta vez, y, previa demarcación del contorno frente al ovoscopio, se procedía a cortar el casquete con un torno.

La obtención de la muestra variaba según la sustancia a analizarse. La muestra para nitrógeno debe tomarse con precauciones especiales, principalmente en los días en que el contenido amniótico es ya esencialmente proteico. Además, es necesario contar con la posible contaminación con clara, yema o sangre en cantidades que pasen inadvertidas al examen macroscópico. La descamación epitelial de la membrana corioalantoidea puede ser un factor importante si se mueve mucho el huevo. En las determinaciones que siguen se supuso que la concentración de nitrógeno total (centrifugado el úrico suspendido) era homogénea en todo el líquido alantoideo. No fué posible verificarlo extrayendo y analizando fracciones de la parte inferior y superior del saco, pero las partes accesibles a la jeringa en la parte superior del huevo no arrojaron variaciones sensibles en el análisis.* Además, los huevos que eran hechos rotar suavemente algún tiempo, con el objeto de homogeneizar el líquido, no diferían significativamente de los restantes en los datos de nitrógeno total.

* Se trataba de huevos en cuyos alantoideos no había aún precipitado úrico.

OPERACIONES GENERALES

Los huevos sacados de la heladera eran cortados con un torno en el perímetro de cáscara correspondiente a la cámara de aire y, en los que se iba a determinar úrico los días en que éste ha precipitado, se marcaba un surco en el ecuador del huevo según el eje mayor. Los huevos se volvían luego a la heladera y eran sacados a medida que se utilizaban; esto evitaba considerablemente las hemorragias.

MUESTRAS PARA NITRÓGENO TOTAL Y DENSIDAD

Determinación de volumen: En cada huevo se levantaba la tapa de la cámara de aire con una tijera curva, y con una jeringa de 2 cc. se tomaban entre 1 y 2 cc. de líquido. En un principio, esta cantidad bastaba para la determinación de densidad y nitrógeno total, que eran los únicos datos hallados. La determinación de volumen * se hizo en estas primeras series inyectando iodato de potasio, en la forma que se detalla más adelante, pero se ensayó toda una serie de métodos, con el resultado de que el más práctico fué el vuelco directo y cuidadoso del huevo; claro que este método comenzó a tener valor sólo después de haber adquirido la necesaria habilidad manual.

Un detalle general de los métodos ensayados es el siguiente:

a) 1. — De manera semejante a la usada en la determinación de volemia se inyectaban 2 cc. de solución de rojo congo en suero fisiológico **, se movía suavemente el huevo y se extraía una muestra. Se determinaba la dilución por colorimetría, y el volumen así determinado se sumaba al extraído previamente con jeringa. Este método se abandonó por dar valores excesivamente altos, debido a la fijación del colorante por las membranas. Las muestras extraídas arrojaban una variación demasiado grande como para que los datos pudieran ser extrapolados a la hora cero.

El ensayo con otros tipos de colorantes no dió mejores resultados.

2. — Por inyección de otras sustancias. No nos fué posible encontrar una sustancia que: 1) no difundiera por las membranas; 2) no se fijara a éstas ni reaccionara con ninguna de las sustancias normalmente presentes; 3) no existiera ya en el alantoideo, directamente o en forma que pudiera interferir en el análisis; 4) fuera rápida y sencillamente analizada sin que interfirieran pequeñas cantidades de proteínas. Tuvimos un éxito relativo con el Iodato de potasio,

* Indispensable para referir los datos de concentración hallados al contenido por huevo.

** Mantenido a pH 7,5 con un buffer de fosfatos.

donde el único factor importante de error es la difusión; fué posible, sin embargo, obtener datos consistentes para muestras extraídas a los diez y veinte minutos. En todos los casos se determinaban dos valores sucesivos para cada huevo.

b) 1. — Por dosaje de la concentración de una sustancia existente ya en el alantoideo, antes y después de agregar un determinado volumen de suero fisiológico, ó 2. — Por dosaje de la concentración de una sustancia existente ya en el alantoideo, en el líquido puro primero, y en el que resulta de un lavado exhaustivo del saco después.

En el primero de los casos se determina el volumen remanente según $V_X = \frac{v C_2}{C_1 - C_2}$ donde v es el volumen agregado y C_1 y C_2 son las

distintas concentraciones. Aplicamos esta técnica a los cloruros, basándonos en datos existentes que indicaban una concentración relativamente alta de esta sustancia en el líquido alantoideo (Kamei). Estos datos eran, sin duda, excesivamente altos, al menos comparados con los nuestros, pues el método de Voldhard no fué suficientemente sensible para determinar cómodamente pequeñas variaciones de concentración. Como micrométodo se ensayó uno en que la eosina actuaba como indicador de absorción (Saifer, Hughes y Scudero), pero no nos fué posible obtener datos reproducibles con este método. Además, las determinaciones por triplicado que exige el método, aumentaban extraordinariamente el trabajo.

El úrico fué dejado de lado por no poderse garantizar la no redisolución del precipitado en los primeros días que se le encuentra, principalmente en los alantoideos ácidos en que, por lo general, el úrico precipita dando, desde una ligera turbiedad, a un líquido lechoso; hemos observado que en esas condiciones un calentamiento suave suele tornar límpido el líquido, o al menos lo aclara.

2. — En el segundo caso se determina el volumen según

$$V_t = \frac{V_1 (m_1 + m_2)}{m_1}$$

donde V_1 es el alantoideo sin diluir, con una cantidad de m_1 de sustancia disuelta, y m_2 es la masa del resto de sustancia extraída mediante un lavaje cuidadoso del huevo. Fiske y Boyden utilizaron este método aplicándolo al ácido úrico. La posibilidad de error por pequeña redisolución del precipitado no es significativa en este caso dada la alta concentración de la sustancia, y de serlo sólo influiría en la cantidad total de sustancias cuya determinación se basara en el volumen así hallado.

No podíamos aplicar este método cuando se determinaban otras sustancias, por la excesiva dilución a la que lleva el abundante lavado (Fiske y Boyden usaban hasta 50 cc.). Hicimos algunas determi-

naciones aisladas aplicando el método a la urea y obtuvimos excelentes resultados; los datos eran muy semejantes a los hallados por vuelco directo, por lo que se siguió operando en esta última forma que nos evitaba duplicar el trabajo por huevo.

Todos estos métodos fueron lógicamente utilizados aplicándolos individualmente a cada huevo, pues para aplicarlos a lotes, de momento que ni las concentraciones ni las cantidades totales son iguales, sería necesario hacer mezclas alícuotas, lo que presupone conocer el volumen. Dijimos que Fiske y Boyden aplicaron el último método, y lo hicieron suponiendo las concentraciones de úrico iguales en todos los huevos, es decir, haciendo una mezcla arbitraria de volúmenes. El error que se puede derivar de ello se ve claramente en el cuadro que sigue, donde consideramos los resultados que derivan de mezclar 2 cc. (a) ó 1 cc. (b) de los líquidos. Las desviaciones en concentración y en volumen que se ven en el cuadro no son excepcionales, pero es evidente que en muchos casos los errores pueden neutralizarse. En el caso de Fiske y Boyden el error no incide naturalmente sobre los datos de úrico, sino sobre las cantidades totales de otras sustancias calculadas a partir de esos datos de volumen, fundamentalmente nitrógeno total.

VOL./HUEVO	Mg. Úrico total	Vol. extr. A		Mg. Úrico en A		Mg. Úrico en B (lavaje)	
		a	b	a	b	a	b
5	5	2	1	2	1	3	4
6	5	2	1	1,7	0,8	3,3	4,2
10	4	2	1	0,8	0,4	3,2	3,6
3	6	2	1	4	0,2	2	5,8
8	4	2	1	1	0,5	3	3,5
Totales: 32	24	10	5	9,5	2,9	14,5	21,1

Volumen total según a: 25,3 cc. (Volumen/huevo = 5,1 cc.)

Volumen total según b: 41,4 cc. (Volumen/huevo = 8,3 cc.)

Volumen real: 32 cc. (Volumen/huevo = 6,4 cc.)

MUESTRA PARA NITRÓGENO TOTAL Y SU DISTRIBUCIÓN

Cuando se necesitó un volumen mayor de alantoideo, fué necesario encontrar otro método de trabajo. La cantidad de huevos con que se operaba hacía de por sí materialmente imposible los anteriores, en lo que respecta a la determinación de volumen. De momento que se determinaba nitrógeno total, era imprescindible seguir obteniendo la fracción necesaria para ello con una pequeña jeringa. Este método, cuando se retira poco líquido (para que la aguja no traumatice las membranas al tratar de agotar el alantoideo), es el que mejor asegura la pureza de la muestra.

Dividimos, entonces, el alantoideo correspondiente a cada huevo en dos fracciones, una (A_1) para nitrógeno total y otra (A_2) para determinar los datos no alterables por pequeñas cantidades de proteínas o cualquier otro tipo accidental de impureza que pudiera derivarse de las operaciones ulteriores

Llegamos al siguiente método: se tomaban seis lotes, tres normales y tres infectados, de diez huevos cada uno. Los huevos descartados por rotura del amnios o cualquier otra contaminación, huevos "sin alantoideo", de embriones anormales (forma, inversiones de posición, tamaño), como así también en los infectados la falta de virus determinable, llevaban a cinco, aproximadamente, la cantidad de huevos por lote. Se separaba, como siempre, el casquete superior de cáscara y se extraían entre 1 y 2 cc. de alantoideo con una jeringa de 2 cc. (muestra A_1). La jeringa se lavaba dos veces con agua tridestilada después de cada extracción. En los infectados se lavaba tres veces para no interferir en la determinación posterior del virus. Estos líquidos se transferían individualmente a tubos de 6 cc. Para el resto de volumen se operaba así: se cortaba cuidadosamente la membrana alantoidea cuidando de no seccionar las venas alantoideas y se la plegaba hacia afuera del huevo sin desgarrar su unión con el embrión. Luego se volcaba el huevo hasta exhaustarlo, por medio de un embudo de 250 cc. de extremo afinado, en probetas de 10 cc., fabricadas especialmente a partir de pipetas de esa capacidad. La obtención del líquido es prácticamente cuantitativa (muestra A_2). Si se vuelca cuidadosamente el huevo así agotado en una cápsula de Petri, es fácil observar que el único alantoideo restante es el que moja las membranas; hemos considerado sistemático el error derivado de ello.

Basándose en los datos así hallados de volumen total, se hacía una mezcla representativa del lote con los alantoideos extraídos con jeringa; según el volumen total, se hacía la mezcla tomando como partes alícuotas un décimo o dos del volumen total (muestra Am_1).

Ejemplo:

HUEVO N.º	A_1 Volumen extr. con ier. cc.	A_2 Volumen obtenido por vuelco cc.	$A_1 + A_2$ Volumen total cc.	Am_1 Muestra para N — 0.1 ($A_1 + A_2$) cc.	Am_2 Muestra para úrico, urea, etc $A_1 + A_2 - Am_1$ cc.
1	1,8	3,3	5,1	0,51	4,6
2	1,5	3,2	4,7	0,47	4,2
3	1,3	2,8	4,1	0,41	3,7
4	1,6	4,7	6,3	0,63	5,7
5	1,5	2,4	3,9	0,39	3,5
Volumen total:			24,1	2,41	21,7

De cada muestra A_1 se tomaba entonces un décimo del volumen total ($A_1 + A_2$) y se agregaba el remanente a A_2 . Se mezclaban las fracciones correspondientes; quedaba así la mezcla de alantoideo dividida en dos partes igualmente representativas: Am_1 , con el volumen necesario para dosar N total y no proteico, y Am_2 , para el resto del análisis.

Antes de hacer las mezclas se tomaban dos precauciones: 1) para todos los huevos: observación cuidadosa de la integridad del amnios, particularmente difícil en los últimos días de incubación, en los que el amnios se ha reducido a una membrana pegada al embrión. 2) Para los huevos infectados: determinación cualitativa del virus, por el método de Salk. (Se agregan 0.1 cc. de alantoideo a 0.9 cc. de solución de glóbulos rojos de pollo en suero fisiológico al 0.3 %. Se hace la lectura cuando han sedimentado todos los glóbulos, basándose en el distinto aspecto de este sedimento. En los alantoideos normales se observa un disco homogéneo central de 2 a 3 mm. de diámetro en el fondo del tubo, mientras que los infectados presentan una capa de glóbulos distribuida difusamente, de borde con frecuencia irregular). En los días quince y sucesivos no se determinaba virus, y sólo se procedía al análisis de los huevos correspondientes a esos días cuando los lotes de días anteriores daban no menos del 90 % de infectados.

La muestra así obtenida para nitrógeno (Am_1) era centrifugada a 1.500 r. p. m. para librarla del úrico suspendido. A veces esto no era necesario aún el día 14 y otras lo era ya en el 12. Se lo hacía como rutina en todos los casos. De esta fracción se tomaban 0.5 cc. para nitrógeno total y 1 cc. para nitrógeno no proteico, y el resto junto con el precipitado, se agregaba a la fracción general (Am_2). Estas se reunían en Erlenmeyer de 50 cc. A su vez todo el líquido se centrifugaba, y de ahí se tomaban las porciones usadas en los otros análisis. El resto del líquido se guardaba a -15°C . El precipitado (Ap) se agregaba al que no había sido arrastrado por el alantoideo al volcar el huevo (Up), y que se obtenía en la siguiente forma: se cortaba la cáscara del huevo por el surco marcado con el torno, en su parte media, y se extraía cuidadosamente el úrico adherido a la membrana que se recortaba junto con la corona de cáscara. Así el huevo, se semivolcaba en una cápsula de Petri de manera que no se desprendiera la membrana del fondo. Girando suavemente el huevo es posible barrer con una pinza curva el úrico precipitado, y transferirlo a pequeñas cubetas con agua. A veces el precipitado se encuentra formando coágulos de tamaño considerable; otras, forma una especie de red que recubre las membranas, siendo en esos casos sumamente engorrosa y problemática su extracción cuantitativa. En esta operación se arrastra una cantidad de impurezas junto con el úrico.

Todo este precipitado (Up), sumado al centrifugado de las dos fracciones de alantoideo (Ap) era lavado varias veces con agua destilada para proceder luego a su disolución y análisis.

TOMA DE MUESTRA DEL AMNÍOS

En los casos en que se determinaba el nitrógeno total del amnios, se procedía a un lavaje repetido del saco alantoideo con agua trides-tilada (estos lavajes se añadían luego al úrico extraído con las pinzas (Up). Se secaba luego el huevo invirtiéndolo parcialmente sobre un papel de filtro. La extracción de la muestra se hacía in situ: dado el pequeño volumen del amnios y a la ausencia de precipitados, se extraían directamente las dos fracciones utilizadas para nitrógeno total y no proteico. Se usaba para esto una jeringa calibrada de 1 cc.; un centímetro cúbico se colocaba directamente en un balón Kjeldahl, y el otro en el tubo donde iba a ser desproteínizado. También en este caso comprobamos previamente la homogeneidad del líquido, al menos para muestras extraídas de la misma zona.

Se procedía luego a volcar el amnios. Se inclinaba el huevo sobre un embudo de 50 cc. de manera que el amnios rebosara del huevo, y se desgarraba entonces la membrana cuidando de no provocar hemorragias. El embrión queda colgando por su pedículo umbilical, y de esta manera es posible hacer escurrir el líquido por las paredes del embudo. El líquido se recoge también en este caso para su medición en probetas de 10 cc.

TOMA DE MUESTRA PARA UREA, AMONÍACO, CREATINA Y CREATININA

La observación en base a datos hallados por el método anterior de que algunas sustancias presentaban variaciones de interés, nos obligó a determinar directamente su cantidad total por huevo, de acuerdo a las consideraciones que siguen:

En los datos hallados anteriormente, se determinaba directamente la concentración, siendo la cantidad total magnitud derivada y expuesta al error sistemático de volumen. Procedimos para estas sustancias a la inversa, es decir, hallamos la concentración en base a la cantidad total. Convenía a ello: 1) la pequeña cantidad existente en el huevo que es, por ejemplo, para el amoníaco, del orden de las γ ; 2) el hecho de que las variaciones de concentración entre normales e infectados eran muy superiores al error que pudiera derivarse del dato de volumen, mientras que la cantidad total era de un orden muy semejante en todos los huevos.

Los detalles de técnica son los siguientes:

Se recorta la membrana alantoidea como siempre y por medio de un embudo se vuelca el alantoideo en una probeta de 10 cc. Se mide el volumen y se pasa a un tubo de ensayo. Se agrega 3 cc. de agua al huevo, se rota éste suavemente y se vuelca el líquido en la probeta teniendo cuidado de observar que el volumen obtenido sean los 3 cc. agregados. Se lavan así el huevo y la probeta. Se añade este líquido al anterior y se repite la operación de lavaje. Se inclina ahora el huevo sobre un papel de filtro, haciéndolo girar de manera que todo el amnios se apoye en éste, hasta que se hayan eliminado los restos de agua de lavaje.

Ahora, en un embudo pequeño, se apoya el amnios y se rompe de manera que el embrión quede escurriendo sobre aquél. En esta posición se lava el embrión con 2 cc. de agua. Si el lavaje del embrión no es rápido son inevitables las hemorragias, con un aumento relativamente considerable del volumen del líquido, además de la impurificación. Se recibe por eso el agua de lavaje en la misma probeta sin transvasar previamente el líquido amniótico, descontando luego los 2 cc. en la lectura del volumen. La suma de líquidos se pasa a un tubo junto con el de lavado posterior de la probeta.

SEGUNDA PARTE

Se dosó nitrógeno total, nitrógeno no proteico, urea, amoníaco, creatina, creatinina y ácido úrico. Se dan datos parciales de densidad que formaban parte de un grupo de determinaciones físicas cuya realización quedó postergada.

Para cada una de esas sustancias se da a continuación, según la secuencia *Antecedentes - Método - Resultados*, los datos existentes en la literatura y los obtenidos por nosotros, con una discusión sumaria del método usado.

Incluimos en los antecedentes todos los trabajos publicados hasta la fecha que tienen relación directa con el nuestro. Hasta el año 1930 esa tarea está magníficamente agotada por Needham; es de lamentar que ese autor no haya leído más cuidadosamente los trabajos originales. De esto último damos razones en las páginas siguientes y en cada caso particular. Es curiosa la ausencia de trabajos relativos a la composición química del alantoideo o del amnios de embrión de pollo, posteriores a 1930. Los abstracts mencionan sólo dos trabajos (Yamada Kichinosuke) correspondientes a 1933; no nos ha sido posible conseguirlos. La bibliografía se agota si agregamos las determinaciones físicas (pH, conductividad, tensión superficial) publicadas recientemente por Walker.

Los datos de ácido úrico, nitrógeno total y no proteico, son el resultado de sumar el soluble y el precipitado. Para facilitar la comparación, damos también las concentraciones de esas sustancias calculando el precipitado como soluble. El precipitado se calcula como compuesto exclusivamente de ácido úrico; como consecuencia fundamental, esto hace que el nitrógeno proteico que calculamos por diferencia se refiera solamente al soluble. Los datos de nitrógeno proteico no coinciden exactamente en los promedios finales con la diferencia entre el total y el no proteico, por la existencia de lotes en los que se dosaba sólo nitrógeno total; esas diferencias no son en ningún caso significativas. Los datos para nitrógeno total comienzan el día octavo de incubación; esos datos, hasta el día once, incluyen el centésimo de miligramo. Excepto ellos, nuestras cifras para nitrógeno y úrico están dadas hasta el décimo de miligramo. Es curioso que Needham ⁽¹⁾ asegure el milésimo de miligramo, en días como el 17 y el 20, utilizando el método de Hopkins.

$$\text{Hemos calculado la desviación standard según } \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n-1}}$$

donde X_i es la diferencia entre los valores hallados y su promedio, y n el número de determinaciones. Por seguir un criterio uniforme hemos hallado la desviación standard en todos los casos, aún en aquellos en los que el reducido valor de n le quita toda utilidad.

Consideramos significativa la diferencia entre dos promedios cuando es mayor del doble de su error standard, calculado según:

$$\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}$$

El cálculo estadístico está en general afectado por el hecho de que los lotes no eran homogéneos en el número de huevos; no hemos hallado una manera simple de evitar ese inconveniente.

NITRÓGENO

ANTECEDENTES

ALANTOIDEO — *Nitrógeno total*

La tabla siguiente muestra los datos existentes en bibliografía:

Día de inoculación	Fiske y Boyden		Kamei mg. %	Targonski mg./h.	Sznerovna mg./h.	Needham mg./h.
	mg. %	mg./h.				
8.....	38,8	0,89	—	—	—	0,095
9.....	43,4	1,52	61	—	—	0,279
10.....	51,1	2,29	—	1,84	0,95	0,5344
11.....	56,3	3,38	—	—	—	0,8772
12.....	79,8	4,81	—	2,77	2,8 (4,2)	1,3161
13.....	114,5	7,35	—	—	—	1,8699
14.....	—	—	572,4	3,19	5,5	2,5546
15.....	—	—	—	—	—	3,3810
16.....	—	—	—	3,75	14,1	4,3376
17.....	—	—	837	—	—	5,5101
18.....	—	—	—	9,65	17,9 (20,1)	6,9155

Los trabajos de Targonski y Sznerovna no pudieron ser consultados, por lo que debemos limitarnos a transcribir los recopilados por Needham (C. E., p. 1094) en la página 1090 de la C. E. aparece la misma tabla de Sznerovna que aquí transcribimos con algunos datos totalmente distintos (día 12, 4,2 mg.; día 18, 20,1 mg.).

Kamei. — Promedios hechos por nosotros de sus determinaciones. Están publicados en concentración; son datos aberrantes según Needham (C. E.), quien al calcular la cantidad por huevo (así están dados en su obra) los hizo aún más aberrantes. Needham tomó los volúmenes dados en "Menge d. verwend. Materials in cem.", como los volúmenes individuales por huevo; así, considera para el día nueve un volumen promedio de más de 8 cc., cuando Kamei considera alrededor de 2 cc. el volumen normal para ese día (76 % de sus extracciones). Needham publica los datos de volúmenes de Kamei (C. E., p. 882). Indiscutiblemente los alantoideos que analizaba Kamei tenían clara. Así lo dice él mismo, creyéndola un constituyente normal. En cambio, asegura que estaban libre de sangre y yema.

Fiske y Boyden. — Datos hallados en base a volúmenes deducidos incorrectamente. (Ver determinación de volumen, pág. 12). Huevos Leghorn incubados a 39^o C.

Needham. — En la última columna agregamos datos de Needham⁽¹⁾ hallados indirectamente. Corresponden a la suma de los "smoothed curve values" de ácido úrico y urea (alantoideo + am-

nios + embrión) expresados como nitrógeno. Según este autor, se comete así un error nada importante. Importante o no, carece de sentido dar esos datos hasta el diez milésimo de miligramo. Needham no tabula esos datos como nitrógeno total del alantoideo, sino como nitrógeno total excretado, pero indica la identidad de esas denominaciones al compararlos con los de Sznerovna (al.). El porqué de sus datos bajos, comparados con los de Sznerovna, lo explica Needham así: —“It would be a legitimate criticism of her results to say that the determination of total N in the allantoic fluid would be gravely upset by the presence of even minutes traces of the blood-vessels and it is not easy to see how it would be possible to obtain allantoic fluid absolutely free from blood”—. Nosotros, Fiske y Boyden, Walker en sus recientes trabajos, etc., lo vemos fácilmente posible.

Nitrógeno no proteico

Se conocen los siguientes datos de Targonski, de la obra de Needham (p. 1099). Debemos hacer notar que la misma obra trae en un gráfico (p. 1096) datos de Targonski en los que el nitrógeno total es en concentración muy inferior a los aquí dados para no proteico (50 mg. % el día 14; 80 mg. % el día 16). El mismo gráfico trae datos de concentración de Kamei muy inferiores (160 mg. % en lugar de 570 para el día 14) a los que éste da en su trabajo.

Evitamos los datos de nitrógeno no proteico de Kamei por las siguientes razones: Kamei, luego de eliminar el grueso de las proteínas con ácido acético, precipita con ácido tánico, *lleva a volumen* (a) el filtrado, sobre una parte alícuota de éste hace un Kjeldahl ⁽¹⁾ y precipita el resto con ácido fosfotúngstico. Hace otro Kjeldahl ⁽²⁾ sobre este precipitado y determina aminoácidos ⁽³⁾ en el filtrado (Van Slyke).

Tiene hallados así tres valores que da en concentración: nitrógeno no proteico ^{(1)*}, nitrógeno no proteico de naturaleza *no precipitable* por el ácido fosfotúngstico ^{(2)**}, y nitrógeno amínico ⁽³⁾. En ⁽²⁾ lo que él halla según el trabajo es el nitrógeno *del precipitado*; no sabemos si halló la diferencia o es un error. Si fuera un error se explicarían al menos dos contradicciones en los datos. Además es posible que los datos de concentración que trae Kamei no se refieran al alantoideo sino a la *dilución con que lleva a volumen* (a) (antes de precipitar con ácido tánico reduce el volumen a presión reducida; eso explicaría que el día nueve, por ejemplo, dé una concentración de nitrógeno no proteico en el amnios, doble a la que da para

* “Reststickstoff”; según la escuela alemana nitrógeno residual es equivalente a nitrógeno no proteico.

** “Reststickstoff der durch P. Wo säure nicht fällbarer Natur”.

nitrógeno total). En cuanto al volumen a que lleva, Kamei se limita a mencionar "que llevaba cuidadosamente hasta la marca".

Needham copia los tres valores, llamando al primero (Kjeldahl sobre el filtrado de ácido tánico) nitrógeno no proteico total, al segundo (?) nitrógeno no proteico no básico, y al tercero (nitrógeno amínico) nitrógeno no proteico básico. Needham no parece advertir las contradicciones en concentración, y da esos valores como referidos directamente al alantoideo y al amnios (C. E., pgs. 1099-1100).

NITRÓGENO NO PROTEICO	Alantoideo mg. %
Día	Targonski
11.....	46
14.....	85
16.....	92
18.....	116

ANNIOS — Nitrógeno total y no proteico

Se conocen solamente datos de concentración. Son los que siguen (mg. %):

DIA	Fiske y Boyden N total	Kamei N total	Targotski	
			N total	N no proteico
11.....	9,5	—	—	—
12.....	5,6	—	40,5	—
13.....	156	—	—	—
14.....	2.450	3,184	58,0	—
16.....	1.500	—	5,450	2,50

MÉTODOS

Nitrógeno total

Utilizamos un sistema de digestión y arrastre que renúncia las últimas modificaciones:

Digestión. — Nos dió excelente resultado el conocido método de Arnold-Gunning con peróxido (Koch y McMeekin). Se coloca la muestra en un Kjeldahl de 100 cc. más 1 cc. de ácido sulfúrico concentrado, 5 ó 6 gotas de sulfato de cobre al 5 % y 0,5 gramos de sulfato de potasio. Se calienta dos horas con micromechero, se enfría, se agregan dos gotas de agua oxigenada al 30 %, y se vuelve a calentar otra hora.

Destilación. — Se usó para el arrastre una modificación del aparato de Parnas y Wagner. Se recogía el destilado en 5 cc. de ácido

bórico (Wagner, adaptación a microescala del método de Winkler) en solución saturada.

Titulación. — Con ClH 0,01 N; como indicador, una mezcla de rojo de metilo y bromo cresol verde (Ma y Zuazaga).

Nitrógeno no proteico

Tuvimos dificultades en desproteinizar el alantoideo sin provocar el arrastre de nitrógeno no proteico (ácido úrico). Convergían a ello dos factores: 1) su alta concentración en ácido úrico, y 2) su baja concentración en proteínas. Este último hecho no permitía alcanzar la dilución que hubiera contrarrestado al primero.

Esas condiciones señalan la posibilidad del uso de un método turbidimétrico o colorimétrico, o una dialización previa al Kjeldahl.

Procediendo con una modificación del método de Folin y Wu para sangre (Van Slyke y Hawkins), o sea diluyendo diez veces, obtuvimos datos reproducibles. Es posible que nuestros datos de nitrógeno no proteico sean sistemáticamente bajos.

El método consiste en agregar al líquido a desproteinizar, un volumen nueve veces mayor de una mezcla de tungstato de sodio al 10 % y ácido sulfúrico 1/12 N en la proporción de 1:8. Prepará-bamos esta mezcla inmediatamente antes de su uso.

Eliminábamos el precipitado por centrifugación; para ello, en lugar de calentar según indican Folin y Wu, dejábamos el líquido en reposo algunas horas.

RESULTADOS

ALANTOIDEO. — NITRÓGENO TOTAL

DÍA	N.º de huevos	N.º de lotes	mg. %	Desv. stand.	mg./h.	Desv. stand.
<i>Infectados</i>						
12.....	35	9	65,2	4,0	3,8	0,4
13.....	36	10	78,7	12,4	5,8	0,9
14.....	54	22	85,6	26,1	5,7	1,7
15.....	19	3	107,0	40,0	5,6	1,3
16.....	38	7	168,6	66,8	10,0	1,9
17.....	7	2	248,7	55,7	9,0	0,1
<i>Normales</i>						
8.....	3	3	13,0	2,1	0,51	0,09
9.....	5	5	36,8	4,9	1,49	0,31
10.....	7	7	37,1	9,7	1,74	0,26
11.....	8	8	44,1	8,2	2,57	0,82
12.....	48	21	57,3	7,0	3,6	0,8
13.....	39	12	70,5	12,1	4,7	1,0
14.....	52	21	103,5	19,3	5,4	1,0
15.....	12	2	205,1	49,0	6,9	0,9
16.....	23	4	342,4	41,8	8,2	1,1
17.....	10	2	704,8	31,4	12,5	1,9

RESULTADOS

ALANTOIDEO. — NITRÓGENO NO PROTEICO

DÍA	N.º de huevos	N.º de lotes	mg. %	Desv. stand.	mg./h.	Desv. stand.
<i>Infectados</i>						
12.....	17	3	53,0	3,9	3,5	0,4
13.....	18	3	48,3	11,0	3,5	0,4
14.....	39	7	47,5	5,8	3,1	0,3
16.....	38	7	90,8	21,1	5,5	0,6
<i>Normales</i>						
12.....	15	3	45,3	6,7	2,3	0,2
13.....	19	3	46,9	9,9	3,1	0,4
14.....	38	7	68,2	10,5	2,9	0,1
16.....	23	4	200,5	38,5	4,8	0,8

ALANTOIDEO. — NITRÓGENO PROTEICO

DÍA	N.º de huevos	N.º de lotes	mg. %	Desv. stand.	mg./h.	Desv. stand.
<i>Infectados</i>						
12.....	17	3	9,4	2,6	0,6	0,2
13.....	18	3	48,5	4,9	3,3	0,5
14.....	39	7	43,1	15,6	2,8	1,4
16.....	38	7	77,8	53,7	4,6	2,5
<i>Normales</i>						
12.....	15	3	22,9	9,1	1,4	0,9
13.....	19	3	37,7	3,8	2,5	0,2
14.....	38	7	60,6	22,1	2,6	1,0
16.....	23	4	142,0	71,1	3,4	1,7

AMNIOS. — NITRÓGENO TOTAL

DÍA	N.º de huevos	N.º de lotes	mg. %	Desv. stand.	mg./h.	Desv. stand.
<i>Infectados</i>						
12.....	3	3	14,0	1,5	0,52	0,12
13.....	3	3	49,8	37,4	1,3	0,02
<i>Normales</i>						
12.....	3	3	8,5	0,6	0,31	0,02
13.....	3	3	83,9	55,7	1,6	0,4

AMNIOS. — NITRÓGENO NO PROTEICO

DÍA	N.º de huevos	N.º de lotes	mg. %	Desv. stand.	mg./h.	Desv. stand.
<i>Infectados</i>						
12.....	2	2	6,6	0,4	0,25	0,05
14.....	20	4	118,8	65,1	1,9	1,4
<i>Normales</i>						
12.....	2	2	3,5	0,8	0,14	0,02
14.....	13	3	117,7	24,6	2,3	0,1

ÁCIDO ÚRICO

ANTECEDENTES

Los datos existentes presentan una divergencia notable, y han sido publicados entre los años 1912 y 1929; corresponden a Needham ⁽¹⁾, Fridericia, Fiske y Boyden, Kamei, Targonski, y Tomita y Takahashi.

Sus datos desde el día 12 son:

DÍA	Needham			Fridericia mg./h.	Fiske y Boyden		Kamei mg. %	Targonski mg./h.	Tomita y Takahashi mg./h.
	Huevos	Lotes	mg./h.		mg./h.	mg. %			
12	27	2	4,177	5,2	10,61	175,9	—	3,51 (3,25)	—
13	25	2	5,822	5,5	15,06	234,6	—	—	—
14	8	1	6,930	11,7	—	—	10,24	4,75 (5,46)	0,3209
15	13	2	10,340	18,6	—	—	—	—	—
16	6	1	13,650	18,8	—	—	—	9,30 (10,95)	—
17	6	1	13,940	42,8	—	—	18,34	—	0,4876
17-18	—	—	—	—	—	—	—	13,74 (16,95)	—
18	—	—	—	49,7	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19,5	—	—	—	57,4	—	—	—	—	—
20	5	2	29,150	—	—	—	—	—	—

Los trabajos precedentes no coinciden ni en el método ni en las partes analizadas.

Needham. — Embrión + amnios + alantoideo. Método colorimétrico de Benedict y Franke, método volumétrico de Hopkins. Huevos Leghorn incubados a 38°C. Needham concede a sus datos más valor que a los de Fridericia, por pertenecer a mayor número de huevos, pero no parece dar importancia a la dispersión que puedan tener los datos. La influencia que pueden tener el embrión más el amnios parece ser considerable según algunos valores de Tomita y Takahashi:

DÍA	Acido úrico Amnios + embrión mg./h.
14.....	0,3583
17.....	3,0578
19.....	7,4465

Eso indicaría que los datos de Needham, especialmente los correspondientes a los últimos días son sensiblemente bajos. Fiske y Boyden dicen encontrar hasta 100 mg. el día 20. Nosotros hemos hallado, en el residuo que queda en el huevo al nacer el pollito, cantidades alrededor de 50 mg. Needham, antes de precipitar con cloruro de amonio,

maceraba el embrión, filtraba y precipitaba proteínas. Nuestra experiencia nos asegura la dificultad de disolver el úrico precipitado en esas condiciones. Needham no menciona ninguna tentativa de verificación al respecto.

Fridericia. — Amnios + alantoideo. Método gravimétrico de Salkovski. (C. E. p. 1091). Sus datos son considerados altos por Needham ⁽¹⁾, quien lo achaca al método usado, que dosa junto con el úrico los compuestos de núcleo purínico. Estos no pueden provenir ni del amnios ni del alantoideo (ver nuestros datos de nitrógeno no proteico) a no ser que Fridericia aplicara el método sin eliminar las proteínas del amnios.

Targonski. — Alantoideo. Método colorimétrico de Morris y McLeod. (C. E. p. 1091; en la página 1094 se repiten estos datos expresados como nitrógeno, pero no se corresponden con éstos. No sabemos si el error es de Targonski o de un cálculo posterior de Needham. En este último caso tampoco sabemos cuál de las dos tablas está equivocada. Targonski “embodied his results in singularly confusing and irregular tables” (Needham). Hemos incluido esos datos en la tabla.

Tomita y Takahashi. — Alantoideo. Método colorimétrico de Folin. Estos valores así como los datos para el amnios + embrión en la nota sobre Needham, corresponden a los datos controles de una experiencia de Tomita y Takahashi en la que los huevos eran inoculados con diversas sustancias. Los autores no indican si estos controles eran inoculados en forma semejante con alguna sustancia inerte.

Fiske y Boyden. — Alantoideo. Método de Folin. Huevos Leghorn incubados a 39°5C. Sus datos son considerablemente altos. Needham (nota al pie de página *Chemical Embriology* p. 1093) recuerda que el método usado dosa ergotionina junto con el ácido úrico. No puede negarse a priori la influencia que pueda tener ese error, pero sería sumamente singular —la ergotionina es un componente de las células sanguíneas (Hunter and Eagles), aunque se le ha hallado en orina en pequeñas cantidades (Sullivan y Hess)— la existencia de concentraciones tales de ergotionina en el líquido alantoideo. El mismo Needham lo considera así al utilizar en sus cálculos la suma de nitrógeno correspondiente a la urea y al ácido úrico, como prácticamente igual al nitrógeno total.

Kamei. — Alantoideo. Método de Folin y Wu. Nos limitamos a dar sus datos en concentración. Needham los publica, en cambio, calculándolos en mg./h., pero el dato que trae para el día 17 (3,11 mg.) no tiene sentido.

La divergencia de datos puede apoyarse en la distinta procedencia de los huevos (Needham y Fiske y Boyden usan huevos Leghorn; Tomita y Takahashi no indican nada al respecto; Kamei usó huevos

“de la misma raza”), en las distintas temperaturas de incubación y en los métodos usados para la determinación de úrico. Tomita, Takahashi y Kamei parecen ignorar la existencia de úrico precipitado. Es de notar que el peso de los embriones de Fiske y Boyden era de un 35 % más alto que los nuestros, debido indudablemente a que incubaban a 39°5C.

MÉTODOS

Hemos usado para el dosaje del ácido úrico el método de Hopkins. Algunos datos aislados con el de Folin y Wu nos dieron resultados concordantes, pero preferimos el primero por evitarnos una excesiva dilución. El objeto fundamental de la puesta a punto de este método*, era la determinación de ácido úrico en amnios, pero algunos ensayos nos convencieron, coincidiendo en ello con Fiske y Boyden, de la existencia de considerable cantidad de sustancia cromogénica no úrica. Las operaciones manuales necesarias no hicieron postergar esas determinaciones.

Se han publicado cuatro sucesivos métodos de purificación del reactivo de Folin (Folin y Trimble, 1924; Folin y Marenzi, 1929; Folin⁽²⁾, 1933; Folin⁽³⁾, 1934). El uso del cianuro de sodio como único álcali comienza en 1930 (Folin⁽⁴⁾); desde ese trabajo comenzamos a repetir los métodos sin mayor éxito; el agregado del reactivo producía una constante turbiedad, que aunque fácilmente centrifugable hacía engorrosa la aplicación del método. La turbiedad desaparecía agregando un exceso de ácido fosfórico, pero con un detrimento considerable de la intensidad del color y la escala de proporcionalidad. Una revisión de los reactivos usados nos indicó: a) la necesidad de verificar la concentración (85 %) del ácido fosfórico; b) la importancia de la pureza del cianuro de sodio (carbonatos, potasio); hemos tenido éxito con muestras de cianuro simplemente puro, donde falló el Merck etiquetado como purísimo (posiblemente frascos viejos). En cambio, no hemos hallado necesario el uso de urea pro-análisis, con considerable ventaja en el costo del reactivo. Algunas variantes del método de Folin exigen una dilución menor (Folin, Wu, Neubauer) pero su valor analítico es muy relativo.

El método de Hopkins (precipitación del úrico como sal amónica y titulación con permanganato) permiten dosar el décimo de miligramo, una vez que se ha adquirido la práctica necesaria en la observación del punto de viraje. Se lo aplica a orina modificando el método para eliminar una sustancia interferente desconocida (Cole,

* El método de Folin es el que más coincide entre los colorimétricos, al menos en orina, con los valores obtenidos usando uricasa (Schaeffer).

tratamiento previo con hierro coloidal dializado; Folin y Shaffer, tratamiento con acetato de uranilo) Needham purificaba el precipitado recristalizándolo en ácido clorhídrico. Nosotros aplicamos directamente el método de Hopkins con ligeras modificaciones: se centrifugó en lugar de filtrar, se lavó una sola vez el precipitado, se disolvió éste en 20 cc. de agua en lugar de 100, y se tituló con una bureta de 2 cc., todo ello en base a que se operaba con menor cantidad de líquido, lo que era posible debido a su alta concentración (se utilizaban 10 cc. de alantoideo). Los precipitados se analizaban titulándolos en las proporciones indicadas por el método; después de lavarlos varias veces con agua destilada, se dejaban varias horas en contacto con unas gotas de hidróxido de sodio saturado; una cantidad de ácido sulfúrico equivalente a este hidróxido de sodio se agregaba luego a la necesaria para obtener la concentración en ácido sulfúrico que indica el método de Hopkins. Se agregaba luego agua y se calentaba hasta dilución. (Fiske y Boyden trataban el precipitado con ácido clorhídrico concentrado, y lo disolvían luego con una mezcla alcalina caliente de fosfatos, en forma semejante a la usada para preparar la solución stock de úrico en el método de Benedict (Benedict e Hitchcock). Esa forma de disolución interfería con nuestro método de determinación). El mismo resultado se logra con carbonato de litio, pero es necesario un calentamiento más prolongado (seguramente por la incapacidad de ese reactivo para disolver la especie de mucus, segregado por las vesículas de Rossi, que recubre el precipitado; eso puede evitarse macerando el precipitado más el carbonato de litio con alundum, pero sin mayor ventaja con respecto al método anterior). El precipitado de los huevos infectados difiere a veces de los normales en su aspecto (es más gelatinoso), pero no difiere en lo que respecta a la dificultad para disolverlos. Hicimos algunas experiencias para determinar el úrico remanente en el huevo después del nacimiento del pollito. Cuando el nacimiento se produce correctamente, es fácil evitar que el pollito arrastre consigo parte del úrico. En esas condiciones, agregando una solución al 10 % de hidróxido de sodio, macerábamos la cáscara con las membranas residuales correspondientes a dos huevos. Dejábamos así varias horas, diluíamos, filtrábamos, precipitábamos proteínas con ácido tungstico y titulábamos según Hopkins. Los resultados, correspondientes a tres experiencias fueron curiosamente concordantes: 49, 50 y 53 mg./huevo.

La naturaleza de este precipitado es de por sí un problema cuyo detalle está aún por resolver. Needham ⁽²⁾ supuso que todo el úrico estaba libre en el alantoideo y que había un ciclo de base para el transporte del úrico al saco. El trabajo de Bialaszewicz y Glogowska sobre el contenido de sodio en el alantoideo parece confirmar eso: el

sodio aumenta hasta un máximo de 22 mg. el día 12, coincidiendo según estos autores con el máximo de volumen (10,3 cc.), y luego disminuye hasta ser cero en el nacimiento del embrión. El potasio crece continuamente hasta un máximo de 7 mg. al fin de la incubación. Fiske y Boyden consideran el mismo ciclo de base pero invertido (los uratos no podrían dializarse por la membrana alantoidea).

Nosotros hemos tratado de orientarnos en la composición del precipitado de la siguiente manera: partes del precipitado, lo más puras posible de trozos de membrana y de sangre, se disolvieron como siempre, se acidificó e hirvió la solución, se filtró y se llevó a 100 cc. En el filtro queda un residuo sumamente variable en peso (de 0,5 a 4 mg. por cada 10 mg. de úrico). Sobre una parte del filtrado se hizo un Kjeldahl y en el resto se determinó úrico. La comparación de los datos indica la presencia en el precipitado de unos 10 mg. por ciento de sustancia nitrogenada soluble que no es ácido úrico.

No se hizo un estudio sistemático de comparación entre los precipitados de huevos normales e infectados, pero ensayos aislados parecen indicar que su contenido en úrico es el mismo. Tabulamos seguidamente esos datos; fueron hechos sobre el total del precipitado de los huevos, lo que nos obliga a desconsiderar la parte no soluble.

Día 17

HUEVOS	N.º de huevos	Nitrógeno úrico (mét. de Hopkins) mg.	Nitrógeno úrico (kjeldahl) mg.	Diferencia por huevo mg.
Infectados	4	10,1	11,4	0,3
Infectados	3	13,8	14,9	0,4
Normales	5	6,0	7,4	0,3
Normales	5	4,6	6,2	0,3

RESULTADOS ALANTOIDEO

ÁCIDO ÚRICO

DÍA	N.º de huevos	N.º de lotes	mg. %	Desv. stand.	mg./h.	Desv. stand.
<i>Infectados</i>						
12	32	6	90,3	8,0	5,6	1,1
13	32	6	119,6	19,4	8,2	1,1
14	39	7	128,9	12,2	8,5	1,6
15	19	3	190,6	32,5	10,9	1,5
16	24	8	176,1	48,6	12,2	1,8
<i>Normales</i>						
12	29	6	87,3	12,0	4,5	1,0
13	33	6	134,4	30,7	7,3	1,5
14	35	6	157,9	16,3	6,7	0,9
15	12	2	344,3	11,8	11,6	1,1
16	16	6	352,5	114,8	11,7	2,3

ÁCIDO ÚRICO PRECIPITADO

DÍA	mg. %	mg./h.	mg. %	mg./h.
	<i>Infectados</i>		<i>Normales</i>	
13	11,5	0,8	5,6	0,3
14	16,9	1,1	50,4	2,1
15	33,9	2,0	206,8	7,1
16	99,6	6,2	333,4	7,9
17	302,2	10,4	716,9	13,1
21	—	—	—	50,7

UREA Y AMONIACO

ANTECEDENTES

Las primeras determinaciones datan de 1825, en que Prévost y Le Royer determinaron cualitativamente urea en el alantoideo. Recién en 1912 Fridericia hizo algunas determinaciones cuantitativas, encontrando 4,5 mg. el día 17 y 1,7 mg. el día 19; Fridericia utilizó el método de Sehondorff. Needham⁽³⁻⁴⁾ fué el primero (1925) en realizar un estudio sistemático; sus datos y los de Kamei son los únicos, pero son sólo relativamente comparables. Los datos de Needham corresponden a la urea presente en el alantoideo, amnios y embrión conjuntamente. Los datos de Kamei corresponden al amnios y al alantoideo por separado. Needham (C. E. p. 1099) señala que Kamei no indica en su trabajo el método usado; nosotros hemos hallado la descripción pertinente sin dificultad; dosaba urea por diferencia en la titulación del amoniaco antes y después de tratar el substrato con ureasa. Los datos de Needham corresponden a un solo lote; se hallaron tratando el substrato con ureasa, destilando el amoniaco y nesslerizando (se dosaba amoniaco por arrastre sin

DÍA	NEEDHAM (alant. + amn. + embr.)		KAMEI	
	N.º de embr.	mg./h.	Alantoideo mg. %	Amnios mg. %
	<i>Urea</i>			
13	8	0,370	—	—
14	6	0,532	21,250	3,370
	<i>Amoniaco</i>			
13	8	0,0556	—	—
14	6	0,0508	3,594	1,928

ureasa). Con embriones de más edad, se determinaba urea en la extracción cetónica del macerado, previa evaporación de ese disolvente.

MÉTODOS

Urea

La digestión enzimática de la urea es base de los mejores métodos existentes para su análisis; éstos consisten en el dosaje del anhídrido carbónico o del amoníaco formados por la acción de la enzima. El anhídrido carbónico se dosa gasométricamente; el amoníaco se aísla por: 1) aereación; 2) destilación con o sin arrastre con vapor de agua; 3) absorción y elución posterior con permutita. Se le dosa colorimétricamente o, excepto en el caso ⁽³⁾ (con permutita), por titulación. Algunos métodos dosan el amoníaco nesslerizando directamente el digerido, previa eliminación de proteínas. En nuestro caso, eso no era posible debido a la alta concentración en uratos del alantoideo. Ese mismo hecho impedía el aislamiento cuantitativo con permutita. Se ensayó en un principio el arrastre con aire (Van Slyke y Cullen, modificación del método de Folin ⁽⁵⁾), pero cada operación con ese método insume un tiempo considerable. Se trató de obviar este inconveniente construyendo una batería para diez análisis simultáneos, pero en esas condiciones, la posibilidad de que el carbonato de potasio utilizado como alcalinizante pase a los tubos colectores de amoníaco obliga a proceder con precauciones tales que no hay ahorro práctico de tiempo.

Se insistió particularmente con el micrométodo de Kinsey y Robison, por la posibilidad que ofrecía de realizar muchos análisis simultáneos. Consiste en la destilación durante una a dos horas a 37°C, del amoníaco formado por la acción de la ureasa, a una gota de ácido bórico con glicerina suspendida en la bóveda de una pequeña campana que cubre el total (en forma semejante al primitivo método de Schlösing para el amoníaco urinario). Se construyeron a ese efecto dedales de vidrio de 1,5 cm. de diámetro por 1 de alto, de borde esmerilado, que cerraban perfectamente sobre portaobjetos excavados, esmerilados en el perímetro correspondiente. Se titulaba con una bureta de 0,1 cc., utilizando como indicador el universal Merck. Los resultados fueron buenos, pero el método debió abandonarse por necesitar una concentración mayor de urea que la que tenían los líquidos a analizar.

Finalmente nos decidimos por arrastrar el amoníaco con vapor de agua, en las condiciones puestas a punto para nitrógeno total. Se comenzaba por eliminar el amoníaco ya existente con permutita, y

se hacía la digestión con buffer de acetato, con el que el pH óptimo de acción de la ureasa es más ácido (6,4; Howel y Sumner), en tubos de 20 cc. tapados con parafilm.* Se los dejaba dos horas a temperatura ambiente y se procedía a su arrastre alcalinizando con 3 cc. de solución saturada de bórax. Se recogía sobre ácido bórico y se titulaba con microbureta y clorhídrico 0,01 normal.

Ureasa

UREASA. — La preparación de un extracto estable de alta concentración nos llevó un tiempo considerable. Actualmente no existe en plaza la ureasa Squibb, y el jack-bean sólo fué recientemente asequible en nuestro país. Los extractos de jack-bean obtenidos por precipitación cetónica, son más activos que la ureasa Squibb. Nosotros utilizamos el poroto moliéndolo y haciendo un extracto alcohólico de la harina, según Folin y Wu. Se conserva perfectamente a 4°C, pero no hemos logrado en ningún momento obtener un nessler límpido con este extracto (Folin y Youngburg).

Las primeras tentativas para lograr un extracto, se hicieron con la harina de soja comercial; fracasaron porque ésta se hallaba incorporada de otras harinas. Moliendo nosotros la semilla, pudimos obtener por desengrase, extracción cetónica en un mezclador Waring y liofilización, extractos analíticamente útiles, pero de baja actividad. Tampoco nos convencieron los extractos obtenidos por precipitación cetónica (Van Slyke y Cullen), extracción alcohólica (Folin y Wu), extracción acuosa y purificación con ácido clorhídrico (Fiske), o extracción glicérica (Koch). No todos estos métodos se adaptaban cómodamente a la poca actividad de la harina que poseíamos.

Se abandonó la soja por la semilla de sandía. Ésta posee el doble de actividad (Damodaran y Sivaramakrishna). Después de ensayar una considerable cantidad de métodos decidimos abandonar la molienda con aparatos mecánicos y la homogeneización en un Waring, para evitar toda posible contaminación con metales pesados, y concretar el método a lo siguiente: se aplasta la semilla en un mortero de madera, se desengrasa calentándola a reflujo con éter (37°C) durante varias horas y se filtra por Buchner lavando repetidamente hasta que el filtrado esté exento de aceite. (El desengrase era innecesario cuando se operaba con el Waring, porque la centrifugación posterior permitía separar fácilmente la grasa sobrenadante). La harina así desengrasada se molía en un mortero y se tamizaba; en esa forma es ya perfectamente utilizable. Para mayor

* Especie de papel a base de caucho y parafina.

comodidad en su uso, obteníamos un extracto soluble tratándola con acetona al 30 %, centrifugando, eliminando por aereación la acetona del líquido decantado, y liofilizando. La actividad del producto oscila alrededor de las 100 U. por gramo. (Unidad de ureasa: según Sumner y Hand, la cantidad de ureasa capaz de desprender un miligramo de nitrógeno de amoníaco de una solución de urea-fosfato a pH 7, a 20°C y en cinco minutos. La urea cristalizada tiene 133.000 U.). Tentados en ese camino tratamos repetidamente de obtener altos concentrados; obtuvimos un máximo de 540 unidades después de un laborioso filtrado con tierra de diatomeas (super cell), pero la mayor cantidad de enzima es eliminada en esos tratamientos.

Amoníaco

El análisis de esta sustancia en el alantoideo es un problema semejante al de su dosaje en sangre, y le convienen por consiguiente las soluciones halladas para éste. Pero a pesar de la rapidez proclamada para esos métodos, son en general laboriosos y no permiten determinaciones en serie. Todos giran alrededor de la destilación al vacío del amoníaco, en aparatos semejantes a los de arrastre de microkjeldahl. Se han publicado algunos trabajos en los que se intenta aislar el NH_3 sanguíneo con permutita (Morgulis y Jahr) o por aereación (Van Slyke y Hiller). En el primero de los casos se ven obligados a agregar 0,5 mg. de amoníaco extra para hacerlo dosable por nesslerización, y en el segundo recurren ya directamente a otro reactivo (fenol e hipoclorito). Esos métodos no han tenido aceptación.

En la forma indicada más abajo hemos hallado algunos datos de orientación que señalan variaciones de interés, entre nuestros datos y los existentes en bibliografía.

Utilizamos como solución aproximada (Folin y Bell) la extracción del amoníaco con permutita (no cuantitativa debido a la gran cantidad de sales; concentraciones superiores a la solución de ringer interfieren), determinándolo luego en su elución directamente por colorimetría (Gentzkow y Masen), o por titulación mediante un arrastre previo (Peters y Van Slyke). En este último caso es necesario proceder al arrastre conjunto del eluido de tres huevos como mínimo.

En los datos de amoníaco dados es de recordar que éste corresponde al soluble, y que no es despreciable la posibilidad de su precipitación como urato amónico. Los análisis realizados sobre el precipitado de úrico indican la presencia de 0,3 mg. de nitrógeno por huevo que no corresponde al ácido úrico y que puede estar parcialmente constituido por amoníaco.

RESULTADOS

AMONIACO. — ALANTOIDEO

DÍA	N.º de huevos	N.º de lotes	mg. %	Desv. stand.	mg./h.	Desv. stand.
<i>Infectados</i>						
14.....	28	10	0,26	0,18	0,014	0,010
16.....	3	3	0,61	0,45	0,035	0,009
<i>Normales</i>						
14.....	21	7	0,37	0,24	0,015	0,009
16.....	4	4	0,87	0,76	0,035	0,021

AMNIOS

<i>Infectados</i>						
14.....	17	12	1,57	0,71	0,039	0,019
16.....	2	2	9,64	7,58	0,038	0,007
<i>Normales</i>						
14.....	17	11	1,47	0,48	0,049	0,017
16.....	4	4	3,32	2,18	0,030	0,015

UREA. — ALANTOIDEO

DÍA	N.º de huevos	N.º de lotes	mg. %	Desv. stand.	mg./h.	Desv. stand.
<i>Infectados</i>						
13.....	16	7	8,68	1,67	0,326	0,131
14.....	48	23	10,39	1,52	0,643	0,163
<i>Normales</i>						
13.....	14	7	11,53	2,29	0,416	0,103
14.....	48	26	12,58	1,35	0,542	0,124
<i>AMNIOS</i>						
<i>Infectados</i>						
13.....	14	6	8,77	0,43	0,296	0,017
14.....	27	18	7,65	1,35	0,216	0,086
<i>Normales</i>						
13.....	12	5	9,34	2,62	0,281	0,050
14.....	20	15	5,85	1,31	0,165	0,073

CREATINA Y CREATININA

ANTECEDENTES

Han publicado datos sobre creatina en el alantoideo Fiske, Boyden y Kamei, y sobre creatinina sólo este último. No hay datos sobre amnios; Kamei tuvo resultado negativo en todas sus determinaciones de creatina y creatinina en el mismo.

DÍA	Creatina Kamei mg. %	Creatina Fiske y Boyden		Creatinina Kamei mg. %
		mg. %	mg./h.*	
9	9,7	—	—	20,3
11	—	6,2	0,31	—
12	—	12,7	0,70	—
14	18,9	—	—	23,0
17	37,9	—	—	56,1

* Deducido según sus datos de volumen para ácido úrico.

MÉTODOS

La creatinina da con el ácido pícrico y en medio alcalino, un color rojo intenso (Jaffé, 1886). En lo que sigue, llamaremos creatina a toda sustancia cromogénicamente semejante. El problema de la especialidad de la reacción de Jaffé está ya aclarado en lo que a la orina se refiere. En sangre la situación es distinta; se sabe que la sustancia cromogénica no es decididamente creatinina, lo que se demuestra fácilmente calentando con hidróxido de sodio o tratando con carbón animal los filtrados de sangre (Behre y Benedict). La creatinina es eliminada con esos procesos, pero no la sustancia cromogénica existente en sangre. Hemos hecho esos ensayos en alantoideo, con el resultado de que la sustancia cromogénica es totalmente eliminada.* Eso no autoriza a suponer que ésta consista totalmente en creatinina, pero sus propiedades son mucho más semejantes a la creatinina que la que se encuentra en sangre. Debemos hacer notar, sin embargo, que el color sigue intensificándose cuando ya los testigos con creatinina han alcanzado la estabilidad.

* En un principio hicimos ensayos de eliminación con carbón activado (Norita), pero esta sustancia, al igual que el caolín (Greenwald y Mc Guire) eliminaba también la sustancia cromogénica sanguínea.

Bossnes y Causky hicieron un estudio sistemático para determinar la concentración óptima de los reactivos en lo que respecta al máximo de color. Su método nos permitió determinar cómodamente la creatinina en cantidades dificultosamente dosables por los anteriores, principalmente en el amnios.

La variación fundamental del método reside en la alcalinidad; se hacía la reacción mezclando 3 cc. del líquido a analizar, con 1 cc. de ácido pícrico 0,04 M. y 1 cc. de hidróxido de sodio 0,75 N. Los líquidos se colocaban en tubos graduados a 20 cc., se desproteinizaban con ácido túngstico, se llevaba a volumen y se centrifugaba. De ahí se tomaban 6 cc. para creatina y 6 para creatinina. Se operaba con la proporción de reactivos que exige el método, pero se llegaba a un volumen final de 10 cc. en lugar de 5. Esto tenía por objeto facilitar la comparación con una serie de tubos preparados simultáneamente con cantidades conocidas.

Para dosar creatina, se procedía, antes de agregar el hidróxido, a calentar la mezcla con ácido pícrico durante una hora en un baño de agua hirviente. Se obtiene el mismo resultado que calentando en el autoclave.

RESULTADOS

CREATININA. — ALANTOIDEO

DÍA	N.º de huevos	N.º de lotes	mg. %	Desv. stand.	mg./h.	Desv. stand.
<i>Infectados</i>						
12.....	21	7	2,44	0,87	0,131	0,034
13.....	22	7	2,23	0,78	0,107	0,023
14.....	20	4	2,04	0,34	0,129	0,025
<i>Normales</i>						
11.....	6	3	0,24	0,11	0,017	0,006
12.....	21	7	2,09	0,66	0,069	0,029
13.....	22	6	3,05	1,95	0,128	0,041

CREATININA. — AMNIOS

<i>Infectados</i>						
12.....	4	4	0,34	0,13	0,015	0,004
13.....	4	4	0,48	0,05	0,015	0,002
<i>Normales</i>						
12.....	3	3	0,49	0,18	0,012	0,005
13.....	5	5	1,05	1,17	0,021	0,012

CREATINA. — ALANTOIDEO

Día	N.º de huevos	N.º de lotes	mg. %	Desv. stand.	mg./h.	Desv. stand.
<i>Infectados</i>						
12.....	21	7	2,22	1,40	0,111	0,054
13.....	16	6	2,95	1,82	0,134	0,082
<i>Normales</i>						
12.....	15	6	3,95	2,13	0,099	0,028
13.....	16	5	3,75	1,35	0,161	0,028

CREATINA. — AMNIOS

<i>Infectados</i>						
12.....	4	4	0,42	0,50	0,016	0,019
13.....	4	4	0,07	0,08	0,002	0,002
<i>Normales</i>						
12.....	3	3	0,26	0,08	0,007	0,003
13.....	5	5	0,24	0,29	0,008	0,011

DENSIDAD

ANTECEDENTES

Kamei determinó el peso específico del alantoideo en los días 9, 14 y 17, por picnometría. Estos datos corresponden al promedio de determinaciones realizadas entre los 11 y los 27°.

Día	Densidad
9	1.0070 (ocho determ.)
14	1.0147 (siete determ.)
17	1.0205 (tres determ.)

Nuestras determinaciones de densidad se limitaron al alantoideo. Aquí también hemos comenzado las determinaciones desde el día 8. Es difícil decidir el criterio a aplicar, cuando se determina la densidad de alantoideos turbios. A veces una simple decantación o centrifugación da un líquido límpido; otras éste es lechoso y sólo aclarable por calentamiento. Estas determinaciones están hechas sobre los alantoideos centrifugados, en las fracciones que se reservaban para las determinaciones de nitrógeno.

MÉTODO

Se utilizó el método comparativo de Barbourg y Hamilton. El método está originalmente adaptado a la determinación de proteínas en sangre y exudados, pero se adaptaba perfectamente a nuestras necesidades.

Consiste en comparar, haciendo uso de una tabla, los distintos tiempos de caída (a una temperatura determinada), de una gota de líquido de densidad conocida y de otra del líquido cuya densidad se busca, en un líquido de baja viscosidad y peso específico algo más bajo que el de las gotas. Las gotas deben ser de 10 mm³, la distancia de caída de 30 cm. y el líquido, contenido en un tubo de vidrio de 7,5 mm. de diámetro, se prepara con una mezcla de xilol y bromobenceno; con una sola mezcla de estos líquidos cubrimos prácticamente todo el margen de variaciones. Usábamos una solución patrón de sulfato de potasio de densidad 1.0075, determinada por picnometría. Los datos están referidos al agua a 15°C.

RESULTADOS

DENSIDAD — ALANTOIDEO

DÍA	<i>Normales</i>			<i>Infectados</i>		
	N.º de determinaciones	Densidad ±	Desv. stand.	N.º de determinaciones	Densidad ±	Desv. stand.
8.....	6	1.0069	0.0002	—	—	—
9.....	10	1.0067	0.0006	—	—	—
10.....	11	1.0067	0.0006	—	—	—
11.....	8	1.0074	0.0005	—	—	—
12.....	13	1.0069	0.0006	—	—	—
13.....	10	1.0074	0.0008	6	1.0076	0.0003
14.....	10	1.0080	0.0010	7	1.0079	0.0010
15.....	5	1.0089	0.0011	—	—	—
18.....	—	—	—	4	1.0104	0.0027

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Es necesario repetir que nuestros datos son sólo relativamente comparables con los ya existentes, y ello debido fundamentalmente a la variación en la temperatura de incubación. En general nuestros datos aparecen atrasados en 24 horas; hemos observado incluso que un cierto porcentaje de huevos nacen el día 22. En ese sentido es importante para establecer un criterio de comparación, el momento en que se establece la comunicación seroamniótica. Los datos de Fiske y Boyden lo colocan entre los días 12 y 13; los de Targonski entre el 14 y 16. Paralelamente los datos de nitrógeno total en alantoideo de Fiske y Boyden son sistemáticamente altos frente a los de Targonski; en cambio los nuestros son más semejantes a los de este último, coincidiendo esto con nuestra observación del momento (día 15-16) en que se establece la comunicación.

Los siguientes cuadros resumen los datos obtenidos, expresados como nitrógeno:

DISTRIBUCIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES NITROGENADAS

Datos comparativos. Huevos infectados (I) y normales (N)

LÍQUIDO ALANTOIDEO

CONCENTRACIONES (miligramos por ciento)

Días de incub.	12		13		14		15		16		17	
	I	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I	N
NITRÓGENO												
total:	65,2	57,3	78,7	70,5	85,6	103,5	107,0	205,1	168,6	342,4	248,7	704,8
no proteico:	53,0	45,3	48,3	46,9	47,5	68,2	—	—	90,8	200,5	—	—
de ácido úrico:	30,1	29,1	39,9	44,8	42,9	52,6	63,5	114,7	55,3	117,4	—	—
de urea:	—	—	3,05	5,38	4,85	5,87	—	—	—	—	—	—
de amoníaco:	—	—	—	—	0,21	0,31	—	—	0,50	0,72	—	—
de creatina:	0,87	1,54	1,15	1,45	—	—	—	—	—	—	—	—
de creatinina:	0,93	0,79	0,85	1,16	0,78	0,83	—	—	—	—	—	—
proteico soluble:	9,4	22,9	48,5	37,7	43,1	60,6	—	—	77,8	142,0	—	—
no proteico indeterminado:	21,1	13,9	3,3	5,9	1,2	8,6	—	—	35,0	82,4	—	—

LÍQUIDO ALANTOIDEO

CANTIDAD TOTAL (miligramos por huevo)

Días de incub.	12		13		14		15		16		17	
	I	N	I	N	I	N	I	N	I	N	I	N
NITRÓGENO												
total:	3,8	3,6	5,8	4,7	5,7	5,4	5,6	6,9	10,0	8,2	9,0	12,5
no proteico:	3,5	2,3	3,5	3,1	3,1	2,9	—	—	5,5	4,8	—	—
de ácido úrico:	1,9	1,5	2,7	2,4	2,8	2,2	3,6	3,9	4,1	3,9	—	—
de urea:	—	—	0,152	0,194	0,290	0,253	—	—	—	—	—	—
de amoníaco:	—	—	—	—	0,012	0,012	—	—	0,029	0,029	—	—
de creatina:	0,043	0,039	0,052	0,063	—	—	—	—	—	—	—	—
de creatinina:	0,050	0,026	0,041	0,049	0,049	0,035	—	—	—	—	—	—
proteico soluble:	0,6	1,4	3,3	2,5	2,8	2,6	—	—	4,6	3,4	—	—
no proteico indeterminado:	1,5	0,7	0,5	0,3	—0,1	0,4	—	—	1,4	0,9	—	—

LÍQUIDO AMNIÓTICO
CONCENTRACIONES (miligramos por ciento)

Días de incub.:	12		13		14		15	
	I	N	I	N	I	N	I	N
Huevos:								
NITRÓGENO total:.....	14,0	8,5	49,8	83,9	—	—	—	—
no proteico:	6,6	3,5	—	—	117,7	118,8	—	—
de urea: ...	—	—	4,10	4,36	3,57	2,73	—	—
de amoníaco:	—	—	—	—	1,29	1,21	7,94	2,73
de creatina:	0,16	0,10	0,03	0,09	—	—	—	—
de creatinina:	0,13	0,19	0,18	0,40	—	—	—	—

CANTIDAD TOTAL (miligramos por huevo)

Días de incub.:	13		13		14		15	
	I	N	I	N	I	N	I	N
Huevos:								
NITRÓGENO total:.....	0,52	0,31	1,3	1,6	—	—	—	—
no proteico:	0,25	0,14	—	—	1,9	2,3	—	—
de urea: ...	—	—	0,138	0,131	0,101	0,077	—	—
de amoníaco:	—	—	—	—	0,032	0,040	0,031	0,025
de creatina:	0,006	0,003	0,001	0,003	—	—	—	—
de creatinina:	0,006	0,005	0,008	0,006	—	—	—	—

Nuestros datos son promedios de valores hallados en distintas épocas y con tandas de huevos presumiblemente distintas en su origen. Este trabajo debió indiscutiblemente haberse realizado con huevos provenientes de un plantel de gallinas sometidas a un tipo fijo de alimentación. Needham apunta la posibilidad de variaciones en la excreción úrica de los embriones según la alimentación de las ponedoras. Aunque contradictorios, se han publicado varios trabajos en los que se estudian las variaciones en la composición del huevo de acuerdo al tipo de alimentación (Pollard y Carr; Gerb y Carr; Calvery y Titus; Titus-Byerly y Ellis-McFarlane; Fulmer y Jukes; Needham: "The effect of pre-developmental factors on development" *Biochemistry and Morphogenesis*, pág. 20). Ese posible tipo de variación, sumada a la estacional y a la propia de los huevos, impide asegurar la significación de la mayoría de las variaciones, que los promedios indicarían, entre normales e infectados.

El análisis de esos resultados indica lo siguiente:

Nitrógeno total (alantoideo).* La comparación de nuestros datos normales con los mencionados en los antecedentes hace destacar el desplazamiento de nuestra curva con respecto a la de Fiske y Boyden, y que inculpamos fundamentalmente a la mayor temperatura de incubación usada por esos investigadores.

La comparación entre normales e infectados indica lo siguiente:

Los promedios (mg/h) correspondientes a los huevos infectados son superiores a los normales en los días 12, 13 y 14 de incubación; ese aumento es significativo el día 13. Desde el día 15 la concentración es significativamente superior en los normales.

Nitrógeno total (amnios). Parece haber un aumento en la concentración y cantidad de nitrógeno total en los amnios infectados de 12 días de incubación. La pequeña cantidad de huevos usados en las determinaciones quita gran parte de su valor a esas deducciones.

* En los gráficos que siguen los trazos llenos corresponden a nuestros datos; las abscisas se refieren siempre a los días de incubación. Las bandas rayadas se trazaron agregando + y — a cada dato. Las curvas normales e infectadas llevan respectivamente una *N* y una *I*. Estos gráficos corresponden al líquido alantoideo.

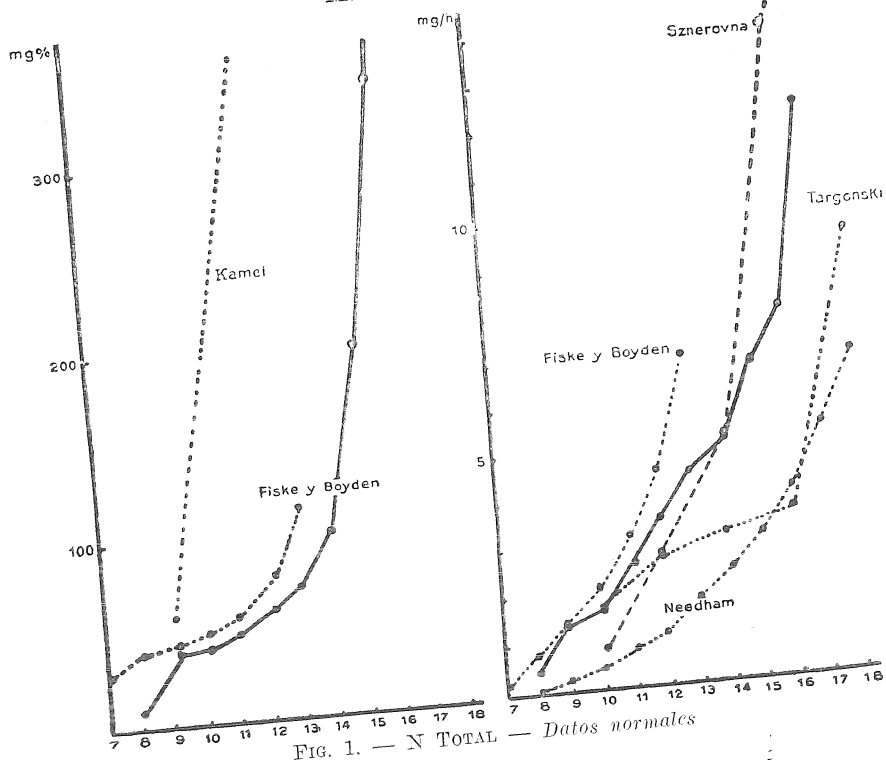


FIG. 1. — N TOTAL — Datos normales

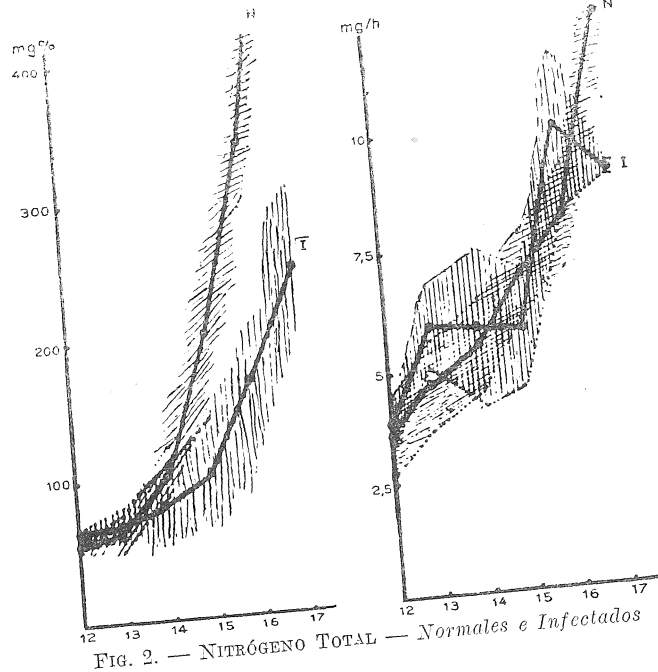


FIG. 2. — NITRÓGENO TOTAL — Normales e Infectados

Nitrógeno no proteico (alantoideo). El siguiente gráfico compara nuestros datos con los de Targonski (concentración); entre el día 14 y 15 se invierten los valores (Fig. 3).

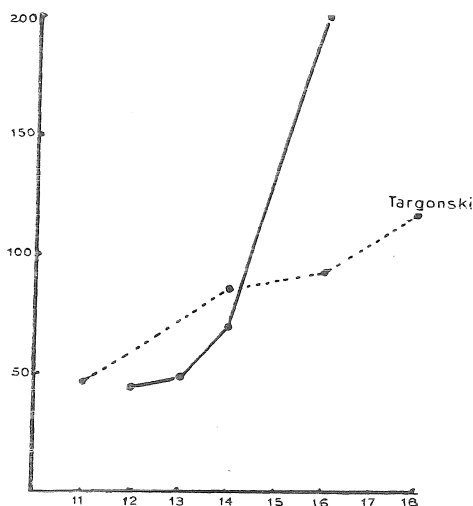


FIG. 3. — N NO PROTEICO — *Datos normales*

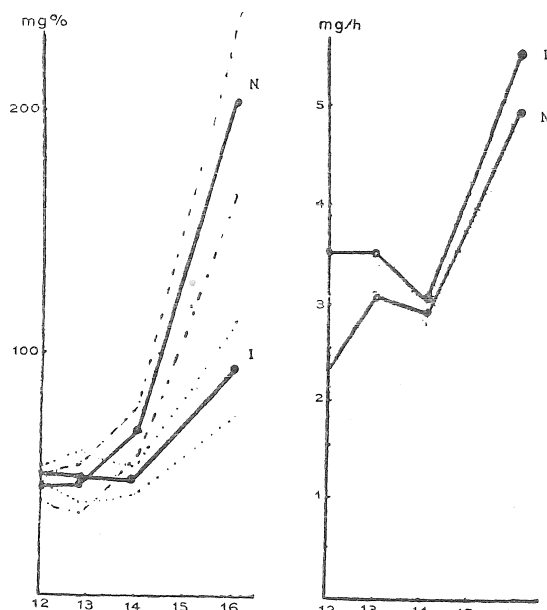


FIG. 4. — NITRÓGENO NO PROTEICO — *Normales e Infectados*

La comparación con los infectados da lo siguiente: la concentración es superior en los normales desde el día 14. Los huevos infectados tienen más nitrógeno no proteico el día 12. El aumento es significativo, pero corresponde a un número pequeño de determinaciones (Fig. 4).

Nitrógeno no proteico (amnios). Igual que en nitrógeno total parece existir un aumento en la concentración y cantidad de nitrógeno no proteico en los amnios infectados del día 12. Esas determinaciones eran una simple guía de la importancia que el contenido amniótico podría tener con respecto al balance general de nitrógeno excretado; las pocas determinaciones efectuadas bastan para indicar su naturaleza secundaria frente al alantoideo. Iguales razones corres-

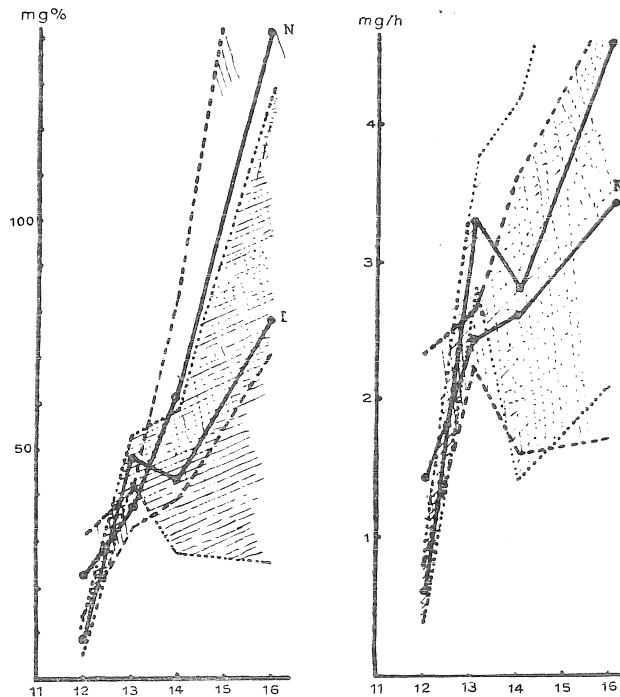


FIG. 5. — NITRÓGENO PROTEICO — Normales e Infectados

ponden a varias determinaciones semicuantitativas realizadas para el ácido úrico. No se observan variaciones entre normales e infectados el día 14.

Nitrógeno proteico (alantoideo). Hemos indicado ya que nos referimos al soluble y que en algunos días estos valores no coinciden con la diferencia entre el total y el no proteico, por corresponder a distintos lotes. Las diferencias están dentro de la dispersión de los datos y además las variaciones son paralelas para los normales e infectados.

El día 12, la concentración es significativamente inferior en los huevos infectados; el día 13 se invierte esa relación y los infectados tienen más nitrógeno proteico. Con el día 14 la dispersión de los datos aumenta en forma considerable (Fig. 5).

Ácido úrico (alantoideo). Los días 12 y 13 nuestros datos de concentración son paralelamente inferiores a los de Fiske y Boyden en forma semejante a lo observado en nitrógeno total. En lo que respecta a la cantidad total, es interesante destacar la semejanza de nuestra curva con la de Needham; ambas señalan dos períodos pobres en la excreción de úrico: Needham, días 13-14 y 16-17; la nuestra, días 13-14 y 15-16 (Fig. 6).

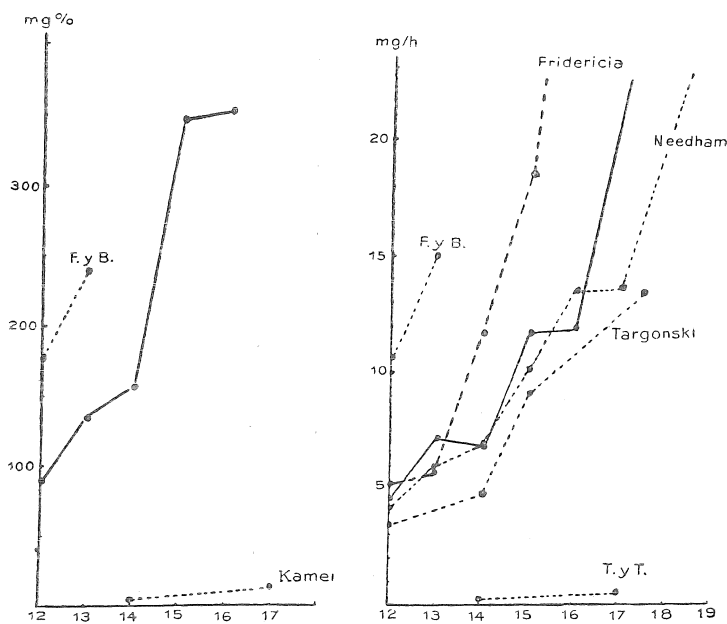


FIG. 6. — ÁCIDO ÚRICO — Datos normales

Los promedios infectados (mg/h) son superiores a los normales los días 12, 13 y 14, siéndolo significativamente este último día. Si se distribuyen los datos parciales alrededor del promedio global de todas las determinaciones correspondientes a esos días, se obtiene una tabla de frecuencia que indica (“chi square test” de Fischer) una mayoría significativa de huevos infectados con altos valores de úrico. A pesar del aumento en excreción que se observa en los infectados el día 14, es posible que estos valores altos tengan su verdadero origen (recordando la naturaleza acumulativa de esa excreción) en el día 12 de incubación (Fig. 7).

En lo que respecta al ácido úrico precipitado, tenemos el siguiente gráfico (los trazos punteados corresponden al ácido úrico total) (Figura 8).

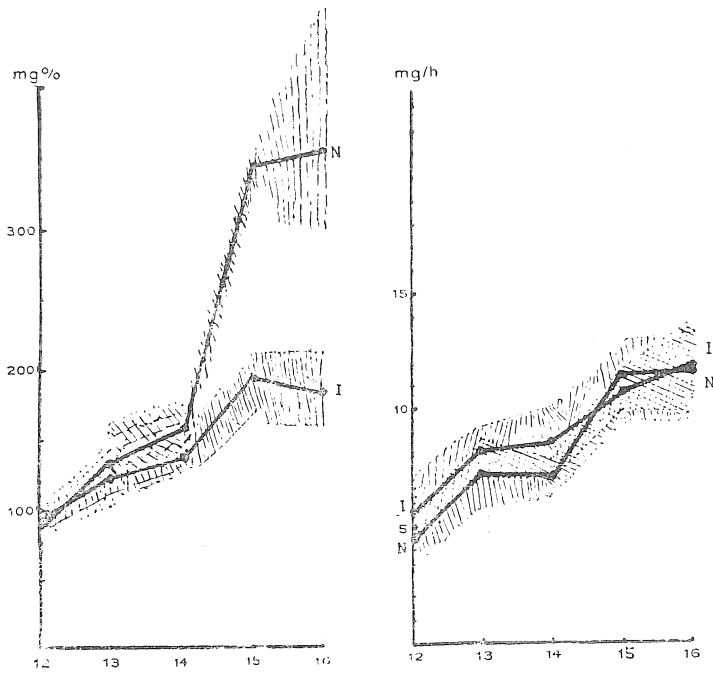


FIG. 7. — ÁCIDO ÚRICO — Normales e Infectados

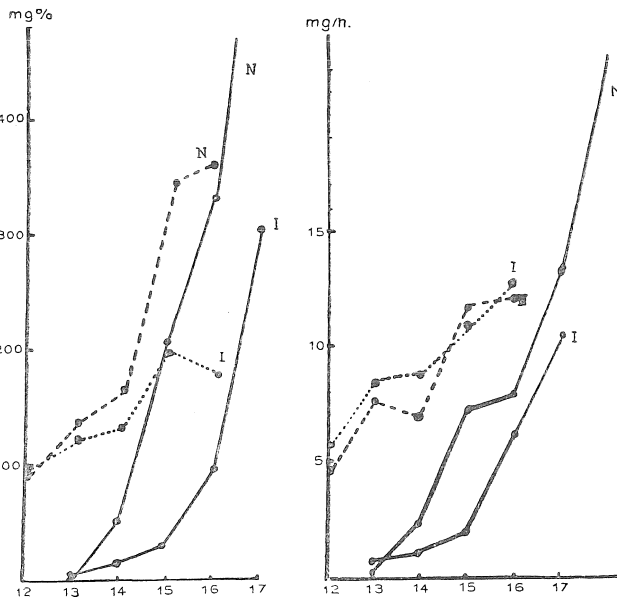


FIG. 8. — ÁCIDO ÚRICO PRECIPITADO — Normales e Infectados

Es evidente la mayor proporción de úrico precipitado en los normales. La cantidad por huevo aumenta rápidamente en los normales desde los días 13 y 14; en los infectados comienza a tener significación desde el día 15.

Urea (amnios y alantoideo). El gráfico siguiente (Fig. 9) compara las concentraciones y las cantidades por huevo correspondientes en cada día (13 y 14) al amnios y al alantoideo. Los datos de concentración de Kamei (alantoideo) son superiores a los nuestros, pero coincide con nosotros en la existencia de una mayor concentración

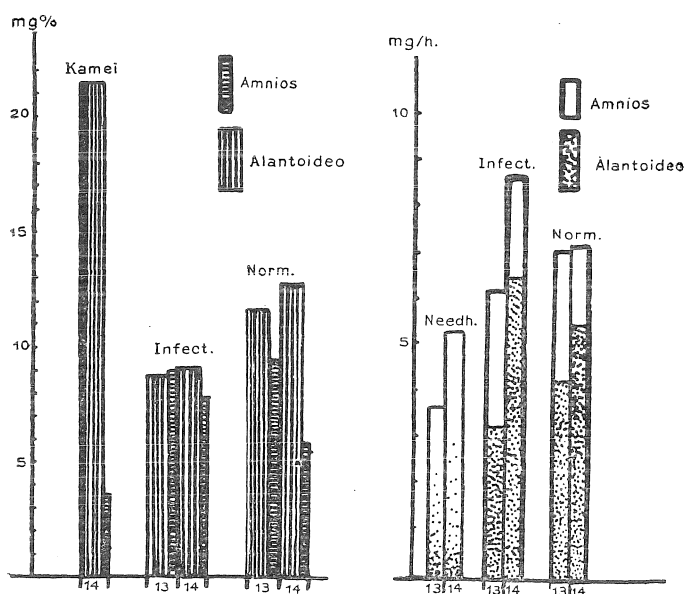


FIG. 9. — UREA — Normales e Infectados

en el alantoideo que en el amnios. Los datos de cantidad total (amnios + alantoideo) de Needham indican un aumento del día 13 al 14 que falta en los nuestros. La concentración es significativamente superior en los normales con (respecto a los infectados) los días 13 (alantoideo) y 14 (alantoideo y amnios). Sin embargo, en este último día hay más urea en los amnios de los huevos infectados; ese hecho se relaciona con la disminución significativa, tanto en concentración como en cantidad total, que se observa en los amnios de los huevos normales del día 13 al 14 y que falta en los infectados. Un hecho interesante es el que para ambos días las concentraciones de los alantoideos normales son respectivamente superiores a las

del amnios, mientras que en los infectados no se observan diferencias significativas.

Amoniaco (alantoideo y amnios). No se observan diferencias entre normales e infectados. El dato de Needham (amnios + alantoideo) del día 14, coincide exactamente con el nuestro. En lo que respecta a la distribución de ese valor entre el amnios y el alantoideo, sólo existen datos de concentración de Kamei. Su valor para amnios (día 14) coincide con el nuestro, pero el que da para alantoideo es diez veces superior. Nuestros datos indican (tanto en los infectados como en los normales) que las concentraciones (día 14 y 16) y la cantidad en miligramos (día 14) son significativamente superiores en los amnios que en los alantoideos.

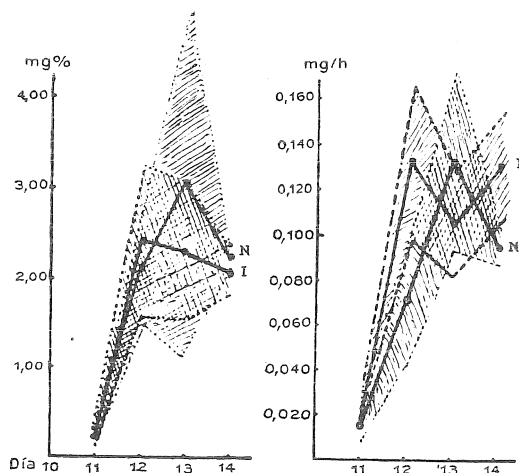


FIG. 10. — CREATININA — Normales e Infectados

Creatina y creatinina (alantoideo). Los días 12 y 14 los huevos infectados tienen significativamente más creatinina (Fig. 10). Los datos para creatina se conservan constantes en los huevos infectados; en cambio en los normales la cantidad total aumenta del día 12 a 13.

Creatina y creatinina (amnios). No se observan diferencias entre normales e infectados. Existen en el amnios cantidades definidas de creatinina, lo cual contradice la única información bibliográfica al respecto (Kamei). Los datos de creatina muestran, en cambio, una elevada dispersión, habiendo dado varios huevos resultados negativos en su análisis.

Densidad (alantoideo). El gráfico incluye las determinaciones de Kamei, de dudoso valor si recordamos sus datos de nitrógeno total (clara). No se observan variaciones entre normales e infectados, al menos en los días estudiados (Fig. 11).

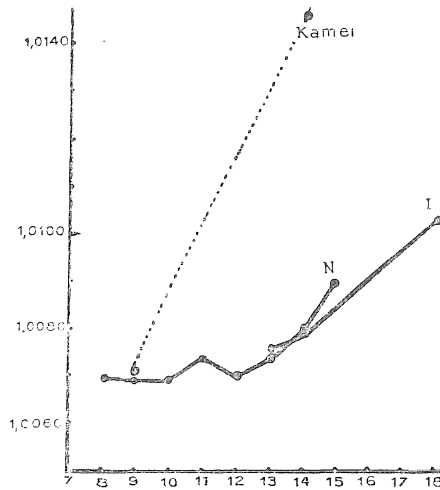


FIG. 11. — DENSIDAD — Normales e Infectados

DISTRIBUCIÓN DEL NITRÓGENO

El siguiente gráfico indica cómo se distribuye el nitrógeno (total, no proteico y de úrico), en los huevos normales y en los infectados.

Los tres trazos limitan tres superficies que corresponden, de abajo hacia arriba, al nitrógeno de úrico, al nitrógeno no proteico residual* y al nitrógeno proteico (Fig. 12).

Se destacan dos hechos: 1) el aumento en nitrógeno total en los huevos infectados, es fundamentalmente debido al proteico. 2) el aumento en nitrógeno no proteico del día 12 en los huevos infectados, es fundamentalmente debido al nitrógeno residual.* Al efecto, sería interesante completar la distribución del nitrógeno dosando aminoácidos, alantoína, etc.

RESUMEN

1) Se estudian distintos métodos para extraer cuantitativamente los líquidos extraembrionarios del huevo de gallina en desarrollo y dosar en los mismos nitrógeno total y las fracciones correspondientes

* Nitrógeno no proteico menos nitrógeno de úrico.

(nitrógeno no proteico, ácido úrico, urea, amoníaco, creatina y creatinina).

2) En el análisis comparado de los líquidos de embriones normales y los de embriones infectados con virus A de influenza, se encuentra un aumento en el nitrógeno excretado o acumulado en el

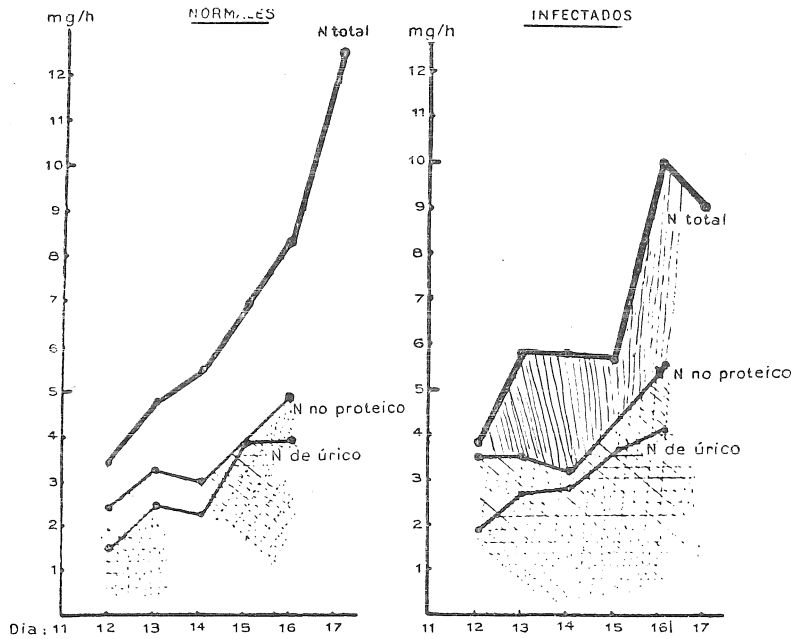


FIG. 12.

líquido alantoideo de los embriones infectados: más nitrógeno proteico, ácido úrico y creatinina. Dadas las pequeñas cantidades de esas sustancias que hay en el líquido amniótico, no puede atribuirse ese aumento al desplazamiento de las mismas de un líquido a otro.

Esas variaciones no se observan después del día 14 de incubación.

BIBLIOGRAFÍA

Las obras y trabajos consultados están aquí ordenadas alfabéticamente según el autor o autores. En los casos en que corresponde más de un trabajo a un mismo autor, se agrega un número guía a cada mención. Se dan algunas citas de trabajos que no pudieron ser directamente consultados, agregando a ellas la fuente indirecta de consulta.

AXELSSON: *Luds. Univ. Arsskrift.*, 1932, 28: 1; (Biochem. and Morphog. Needham).

BARBOURG AND HAMILTON: "The falling drop method for determining specific gravity", *Jour. Biol. Chem.*, 1926, 69: 625.

- BEHRE AND BENEDICT: *Jour. Biol. Chem.*, 1922, 52: 11.
- BENEDICT AND HITCHCOCK: "On the colorimetric estimation of uric acid in urine", *Biol. Chem.*, 1922, 52: 387.
- BERKELEY UNIT N° 1: "Research staff of United States Navy Medical research", *J. Gen. Physiol.*, 1945, 28: 585.
- BIALASZEWICZ Y GLOGOLWSKA: *Acta Biol. Exp. (warszawa)* 1938, 1350; (*Biochem. and Morphog.*, Needham, pág. 662).
- BOSSNES Y CAUSSKY: "On the colorimetric determination of creatinine", *Jour. Biol. Chem.*, 1945, 158: 581.
- CALVERY AND TITUS: *Jour. Biol. Chem.*, 1934, 105: 683.
- COLE: *Practical Physiological Chemistry*, Cambridge, 1928.
- DAMODARAN Y SIVARAMAKRISHNA: "New sources of urease for determination of urea", *Biochem. Jour.*, 1937, 31: 1041.
- FISKE: "The determination of urea in urine by the urease method", *Jour. Biol. Chem.*, 1915, 20: 455.
- FOLIN: (1) "A system of blood analysis. Supplement III. A new colorimetric method for the determination of amino acid in blood", *Jour. Biol. Chem.*, 1922, 51: 377. "A colorimetric determination of the amino acid N in normal urine", *Jour. Biol. Chem.*, 1922, 51: 393.
- FOLIN: (2) "Standardized methods for the determination of uric acid in unclaked blood and in urine", *Jour. Biol. Chem.*, 1933, 111: 101.
- FOLIN: (3) "Preparation of sodium tungstate free from molybdate, together with the simplified process for the preparation of the correct uric acid reagent (and some comments)", *Jour. Biol. Chem.*, 1934, 106: 311.
- FOLIN: (4) "Improved method for blood uric acid". *Jour. Biol. Chem.*, 1930, 86: 179.
- FOLIN: (5) "Eine neue Methode zur Bestimmung des Amoniaks in Harne un andero thierischen Flüssigkeiten", *Zeit. Physiol. Chem.*, 1902, 3-7, 161.
- FOLIN Y MARENZI: "The preparation of uric acid reagent completely from phenol reagent", *Jour. Biol. Chem.*, 1929, 83: 109.
- FOLIN UND SHAFFER: "Über die quantitative Bestimmung ded Harnsäure zin Harn", *Z. Physiol. Chem.*, 1901, 32: 552.
- FOLIN Y TRIMBLE: *Jour. Biol. Chem.*, 1924, 60: 473.
- FOLIN Y WU: "A system of blood analysis", *Jour. Biol. Chem.*, 1919, 38: 81.
- FOLIN - WU - NEUBAUER: "Dosaje del ácido úrico". *Análisis Clínicos*. Meyer-Lenhartz. 2da. edición española, 1936, pág. 97.
- FOLIN Y YOUNBOURG: "Note on the determination of urea in urine by direct nesslerization". *Jour. Biol. Chem.*, 1919, 38: 11.
- FRIDERICIA: *Skand. Jour. Exp. Biol.*, 1924, 4: 145. (Chem. Emb. Needham).
- GENTZKOW AND MASEN: *Laboratory methods of the United States Army*. Simmons and Gentzkow. 5ª Ed. Filadelfia, 1944, pág. 203.
- GERBER Y CARR: *Jour. Nutrition*, 1931, 3: 245.
- GODFREY: *Poultry Science*, 1936, 15: 294.
- GREENWALD Y McGUIRE: "The estimation of creatine and creatinine in the blood". *Jour. Biol. Chem.*, 1918, 34: 103.
- HAGERDON JENSEN: "Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid". *Biochem. Z.*, 1923, 135: 46.
- HIRST: "The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination". *J. Exp. Med.*, 1942, 75: 49.
- HOPKINS: "On the estimation of uric acid in urine. A new process by means of saturation with ammonium chloride". *Proc. Roy. Soc. London*, 1892, 3-52-93. *Chem. News.*, 1893, 66: 106.

- HOWEL Y SUMMER: "The specific effects of buffers upon urease activity". *Jour. Biol. Chem.*, 1934, **104**: 619.
- HUNTER AND EAGLES: "The isolation from blood of a hitherto unknown substance and its bearing on present methods for the estimation of uric acid". *Jour. Biol. Chem.*, 1927, **72**: 123.
- KINSEY Y ROBISON: "A micromethod for the determination of urea". *Jour. Biol. Chem.*, 1946, 162.
- KOCH: "A stable and convenient urease reagent". *Jour. Lab. Clin. Med.*, 1926, **11**: 776.
- KOCH AND McMEEKIN: "A new direct nesslerization mikrokjeldahl method and a modification of the Nessler-Folin reagent for ammonia". *J. Am. Chem. Soc.*, 1924, **46**: 2066.
- MA Y ZUAZAGA: "Mikrokjeldahl determination of N. A new indicator and an improved rapid method". *Ind. Eng. Chem.*, 1942, **14**: 280.
- McFARLANE, FULMER, JUKES: *Biochem. Jour.*, 1930, **24**: 1611.
- MORGULIS Y JAHR: "Determination of ammonia in the blood". *Jour. Biol. Chem.*, 1919, **38**: 435.
- NEEDHAM: *Chemical Embriology* - Cambridge, 1931.
- NEEDHAM: *Biochemistry and Morphogenesis* - Cambridge, 1942.
- NEEDHAM: (1) "The energy sources in ontogenesis. II) The uric acid content and the general protein metabolism of the developing avian egg". *Brit. Jour. Exp. Biol.*, 1926, **3**: 189.
- NEEDHAM: (2) *Nature*, 1931, **128**: 152.
- NEEDHAM: (3) "The energy sources in ontogenesis. I) The urea content of the developing avian egg". *Brit. Jour. Exp. Biol.*, 1926, **4**: 114.
- NEEDHAM: (4) "The energy sources in ontogenesis. III) The ammonia content of the developing avian egg and the theory of recapitulation". *Brit. Jour. Exp. Biol.*, 1926, **4**: 145.
- PARNAS Y WAGNER: *Biochem. Z.*, 1921, **125**: 253.
- PARODI Y LAJMANOVICH: "Metabolismo de las membranas corioalantoideas de embrión de pollo infectado con virus "A" de influenza". *Rev. de la Soc. Arg. de Biol.*, 1947.
- PENNIMPEDE: "Acción del virus "A" de influenza sobre el peso de los distintos constituyentes del huevo de gallina en desarrollo". Tesis, Universidad de La Plata. *Rev. del Instituto Bacteriológico "Malbrán"* (en prensa).
- PENNIMPEDE, PARODI, LAJMANOVICH Y MITTELMAN: "Modificaciones producidas en el huevo fértil de pollo por la inoculación del virus "A" de influenza. I) Distribución del virus.
- MITTELMAN, LAJMANOVICH, PARODI Y PENNIMPEDE: II) Consumo de oxígeno y producción de anhídrido carbónico.
- LAJMANOVICH, MITTELMAN, PARODI Y PENNIMPEDE: III) Volumen y pH del líquido alantoideo.
- PARODI, PENNIMPEDE, LAJMANOVICH Y MITTELMAN: IV) Peso de los embriones y membranas corioalantoideas". *Rev. Inst. Bact. "Malbrán"* (en prensa). *Ciencia e Investigación*, 1947, **III**: 392.
- PENIONSKEVITCH: *Arch. f. geflügelkunde*, 1936, **10**: 437. (Biochem. and Morphog. Needham).
- PETERS Y VAN SLYKE: *Quantitative clinical chemistry*, 1932.
- POLLARD CARD: *Amer. Jour. Physiol.*, 1924, **67**: 589.
- RACKER Y KRIMSKY: "Inhibition of phosphorylation of glucose in some brains by viruses and its prevention by preparation of disphosphopyridine nucleotide". *Jour. Exp. Med.*, 1946, **84**: 191.

- SAIFER, HUGHES AND SCUDERO: "Determination of chlorides in biological fluids by the use of adsorption indicators. The use of cosin for the volumetric microdetermination of chlorides in acetone filtrates of biological fluids". *Jour. Biol. Chem.*, 1941, **141**: 495.
- SHAEFFER: "The determination of uric acid in urine with crude uricase". *Jour. Biol. Chem.*, 1944, **153**: 163.
- SULLIVAN Y HESS: "Ergothioneine in the urine". *Jour. Biol. Chem.*, 1933, **102**: 67.
- SORDELLI, TAYLOR Y PARODI: "Estudio de los virus de la epidemia de influenza ocurrida en la Argentina durante el año 1940". *Rev. Inst. Bact. "Malabrán"*, 1941, **10**: 265.
- SUMMER Y HAND: *Jour. Biol. Chem.*, 1928, **76**: 149.
- SZNEROVNA: *Trav. du Lab. Physiol. de l'Inst. Nencki*, Varsovie, 1921, **I**: N° 3 (Chem. Emb. Needham).
- TARGONSKI: *Trav. de l'Inst. Nencki*, Varsovie. 1927, **4**: N° 2. (Chem. Emb. Needham).
- TITUS, BYERLY Y ELLIS: *Jour. Nutrition*, 1933, **6**: 127.
- TOMITA Y TAKAHASHI: *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1929, **184**: 292.
- UTTER, REINER Y WOOD: "Measurement of anaerobic glycolysis in brain as related to poliomyelitis". *Jour. Exp. Med.*, 1945, **82**: 217.
- VAN SLYKE Y CULLEN: "A permanent preparation of urease and its use in the determination of urea". *Jour. Biol. Chem.*, 1914, **19**: 211.
- VAN SLYKE Y HILLER: "Determination of ammonia in blood". *Jour. Biol. Chem.*, 1924, **61**: 523.
- VAN SLYKE Y NEILL: "The determination of gases in blood and solutions by vacuum extraction and manometric measurement". *Jour. Biol. Chem.*, 1924, **61**: 523.
- VOLHARDT: *Determinación de cloruros*. Tratado de química normal y patológica de la sangre. *Corona*, Santiago de Chile, 1942, 3ª edición.
- WAGNER: "Titration of ammonia in presence of boric acid". *Ind. Eng. Chem.*, A. ED. 1940, **12**: 771.
- WALKER: "Physical properties of the allantoic and amniotic fluids of the chick. I) Specific Cond. II) Hydrogen ion concentration". *Jour. Gen. Physiol.*, 1943, **26**: 495.
- YAMADA KICHINOSUKE: "Ueber den zucker in Fruchtwasser Beobachtungen im Fruchtwassers des Hähnerembryos". *Jap. Jour. Med.*, Sc. II. Biochem. **2** (1), 1933, **47**: 69. — "Ueber das Vorkommen von Lävulose in Fruchtwasser des Hühnerembryos". *Jap. Jour. Med.*, Sc. II Biochem. **2** (1), 1933, **107**: 113.
- YOUNG, MCPHERSON, WENTWORTH Y HAWKINS: "Estimation of allantoin". *Jour. Biol. Chem.*, 1942, **142**: 839. — *Jour. Biol. Chem.*, 1944, **152**: 245.