Modificaciones producidas en el huevo fértil de pollo por la inoculación del virus "A" de influenza

II. - CONSUMO DE OXIGENO Y PRODUCCION DE ANHIDRIDO CARBONICO

por
N. Mittelman, S. Lajmanovich, A. S. Parodi y F. C. Pennimpede

De acuerdo con el plan trazado en (1) para el estudio de las modificaciones que la inoculación del virus "A" de influenza produce en el huevo fértil de pollo, se hace en el presente trabajo un estudio comparativo del consumo de oxígeno y producción de anhidrido carbónico de huevos fértiles inoculados con virus "A" de influenza y huevos fértiles normales en condiciones similares.

Se debe hacer notar que si bien los resultados obtenidos, coinciden en general, en lo referente a huevos fértiles normales, con los indicados en la abundante bibiografía existente al respecto (Needham (2), no pueden considerarse extrictamente comparables, debido a que la temperatura de inoculación utilizada (37°C.) no es la óptima para embriones normales y además a las alteraciones que significan las perforaciones practicadas en la cáscara y la inoculación del líquido alantoideo normal.

En razón de la técnica utilizada es probable que todos los valores relativos a consumo de oígeno sean algo bajos. Este hecho no tiene, a los efectos del trabajo, mayor trascendencia, dado que lo que interesa es la comparación de los valores referentes a huevos fértiles normales e inoculados con virus en condiciones similares.

TÉCNICAS UTILIZADAS

El material y método de inoculación ya fué descripto en la parte I de esta serie (1).

De la Sección Virus del Instituto Bacteriológico "Dr. Carlos G.Malbrán", de la Secretaría Nacional de Salud Pública. Estos estudios fueron subvencionados en parte por una donación de la International Health Division de la Fundación Rockefeller.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 28 de noviembre de 1946.

Consumo de oxígeno: el consumo de oxígeno fué determinado midiendo la variación que en el contenido normal de oxígeno del aire, producían 8 huevos fértiles, durante un cierto tiempo (1 hora o 1/2 hora) a 37°C. y en recinto cerrado (desecadores termostatizados). El detalle de los dispositivos está esquematizado en la figura Nº 1. Una solución concentrada de hidróxido de potasio, en el fondo de los desecadores, evitó la acumulación nociva de anhidrido carbónico.

La determinación de oxígeno propiamente dicha se hizo sobre muestras tomadas de los desecadores con las precauciones del caso, en un aparato de Haldane y los resultados referidos a condiciones normales (0°C. y 760 mm.)

En experiencias previas se determinó asimismo que en los intervalos de tiempos empleados (1 hora 1/2 hora) había proporcionalidad entre consumo de oxígeno y tiempo, indicando que la disminución de tensión de oxígeno producida en el curso de la experiencia no afectada sensiblemente el consumo del mismo por los embriones.

Producción de anhidrido carbónico: los huevos provenientes de la determinación de oxígeno, eran colocados en tubos termostatizados a 37°C. convenientemente conectados con una cadena de tubos de absorción; una corriente de aire libre de anhidrido carbónico se hacía circular por el sistema durante una hora. (La técnica utilizada es similar a la descripta por Murray (3). La figura Nº 2 representa en forma esquemática el dispositivo utilizado. La producción de anhidrido carbónico se determinó por pesada y se expresó finalmente en centímetros cúbicos en condiciones normales.

También en este caso se comprobó previamente la independencia de la cantidad de anhidrido carbónico producida de la intesidad de la corriente de aire.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

De acuerdo con las técnicas descriptas se hicieron determinaciones simultáneas en huevos normales e inoculados con virus "A" de influenza a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas después de inoculados.

Los resultados obtenidos se hallan resumidos en la tabla Nº 1 y representados gráficamente en las figuras 3, 4, 5, 6 y 7. En todos los casos se estudió la significación estadística de los resultados.

El análisis de los valores obtenidos muestra que a excepción del valor correspondiente a las 24 horas, el consumo de oxígeno por huevo es consistentemente menor en el huevo inoculado con virus que en el normal correspondiente (figura Nº 3).

Es interesante hacer notar que en las 24 horas el consumo de oxígeno por huevo es "significativamente" mayor en el inoculado con virus que en el normal.

En la producción de anhidrido carbónico por huevo a las 24 horas no hay diferencias "significativas"; a partir de las 48 horas los

CUADRO I

Días de desarrollo	Horas después de inoculadas	N = inoc. con liq. alant. normal I = inoc. con virus A influenza	Consumo de oxígeno cc/huevo por hora (1)	P (2)	Producción CO^2 cc/huevo por hora (1)	P (2)	Consumo de oxígeno cc/gr. embrión por hora (1)
12	24 h.	N	4.77 ± 0.17	0.05*	3.86 ± 0.11	> 0.5	1.06 ± 0.03
		I	5.62 ± 0.06		3.75 ± 0.15		1.16 ± 0.05
13	48 h.	N	7.48 ± 0.37	> 0.6	5.16 ± 0.18	> 0.3	1.13 ± 0.06
		I	7.29 ± 0.36		4.90 ± 0.70		1.21 ± 0.05
14	72 h.	N	10.45 ± 0.60	0.02*	7.20 ± 0.22	0.02*	1.18 ± 0.04
		I	8.14 ± 0.76		5.90 ± 0.35		1.12 ± 0.05
15	96 h.	N	13.17 ± 0.88	0.05*	9.02 ± 0.54	0.01*	1.20 ± 0.04
		I	10.45 ± 0.96		6.94 ± 0.49		1.17 ± 0.03
16	120 h.	N	16.34 ± 0.89	> 0.1	11.05 ± 0.63	< 0.02*	1.16 ± 0.06
		I	14.01 ± 1.08		8.45 ± 0.72		1.13 ± 0.07
17	144 h.	N	18.05 ± 1.34	< 0.05*	12.49 ± 0.67	<< 0.01*	1.11 ± 0.06
		I	13.97 ± 0.83		9.35 ± 0.25		1.10 ± 0.05

P (2)	Producción CO^2 cc/gr. embrión por hora (1)	P (2)	Cociente Respiratorio (1)	P (2)
0.1	0.84 ± 0.03 / 0.81 ± 0.03	> 0.4	0.81 ± 0.03 / 0.71 ± 0.03	< 0 05*
> 0.6	0.81 ± 0.02 / 0.82 ± 0.03	> 0.6	0.64 ± 0.05 / 0.70 ± 0.05	> 0.3
> 0.3	0.81 ± 0.01 / 0.78 ± 0.02	> 0.3	0.68 ± 0.02 / 0.72 ± 0.03	> 0.3
> 0.6	0.80 ± 0.03 / 0.78 ± 0.02	> 0.5	0.69 ± 0.02 / 0.69 ± 0.03	1
> 0.7	0.75 ± 0.03 / 0.73 ± 0.04	> 0.5	0.65 ± 0.05 / 0.65 ± 0.04	1
> 0.8	0.72 ± 0.02 / 0.75 ± 0.03	> 0.3	— / —	—

huevos inoculados con virus producen consistentemente menos anhidrido carbónico que los normales, (figura Nº 4).

(1) Valores medios de 6 a 10 determinaciones con el error standard; el error standard fué calculado de acuerdo a la fórmula para pequeñas muestras:

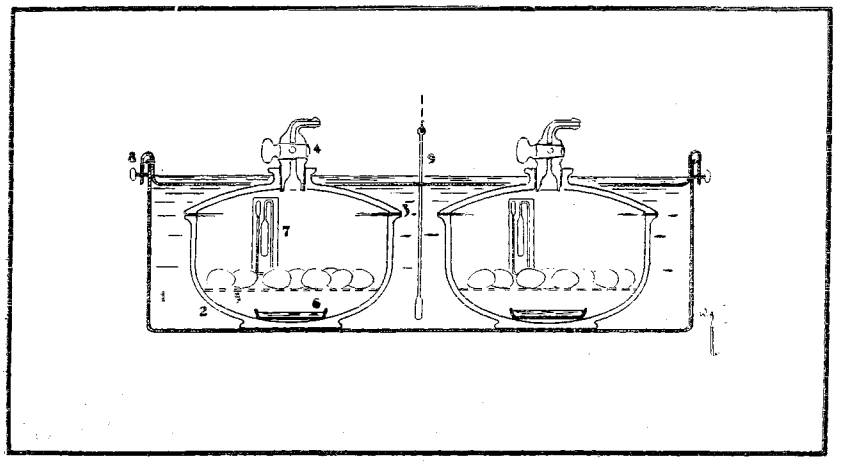
$$\sigma_x = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \; ; \; \sigma = \sqrt{\frac{\Sigma (x^2)}{N - 1}}$$

(2) "P" es la probabilidad que la diferencia entre N e I sea debida al azar. Fué calculada de acuerdo a la tabla de Fisher (Statistical Methods for Research Workers, pág. 177); el error standard de la diferencia entre los términos medios fué calculado de acuerdo a la fórmula:

$$\sigma_D = \frac{S}{\sqrt{\frac{N_1 \, N_2}{N_1 + N_2}}} \quad : \quad S^2 = \frac{\Sigma (x1)^2 + \Sigma (x2)^2}{N_1 + N_2 - 2}$$

(*) La diferencia entre los términos medios fué considerada "significativa" cuando $P \leq 0{,}05$.

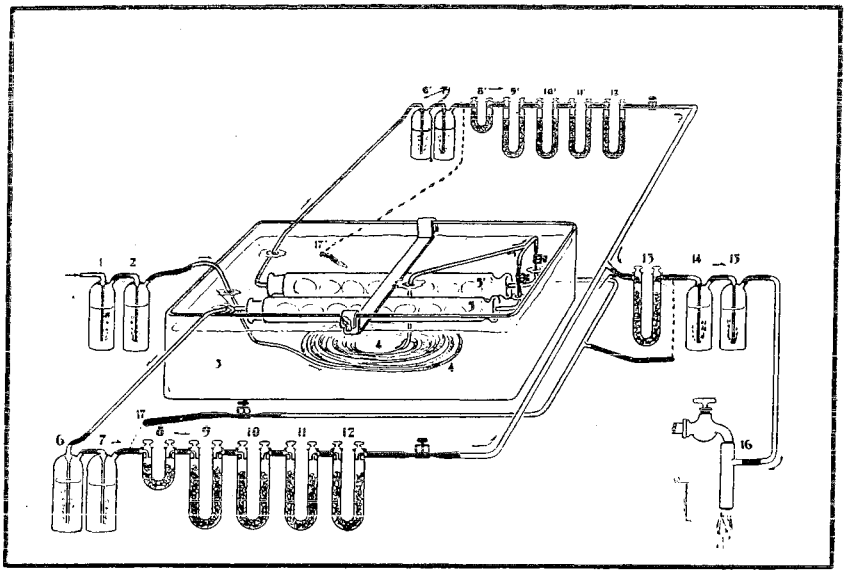
Figura Nº 1



Aparato para determinación de oxígeno

(1) Baño termostatizado.
(2) Desecadores de 6 litros.
(4) Tapón a través del cual era extraída la muestra.
(5) Huevos.
(6) Solución concentrada de KOH.
(7) y (9) Termómetro.
(8) Pinzas.

Figura Nº 2



Aparato para determinación de CO2

(1) Solución concentrada de KOH.
(2) Agua destilada.
(3) Baño termostatizado.
(4) Caño para calentar la corriente de aire libre de CO_2.
(5) Tubos con huevos.
(6, 7, 14 y 15) SO_4 H_2 concentrado.
(8, 12 y 13) Anhidrona (ClO_4 Mg.).
(9, 10 y 11) Cal sodada.
(16) Trompa de agua.

El peso 8,8 y 13 debe permanecer constante durante el experimento. El aumento de peso de 9 + 10 + 11 + 12, 9' + 10' + 11' + 12' representa la producción de CO_2.

Antes de comenzar el experimento el aparato era liberado de CO_2 a través del tubo 17.

Figura Nº 3

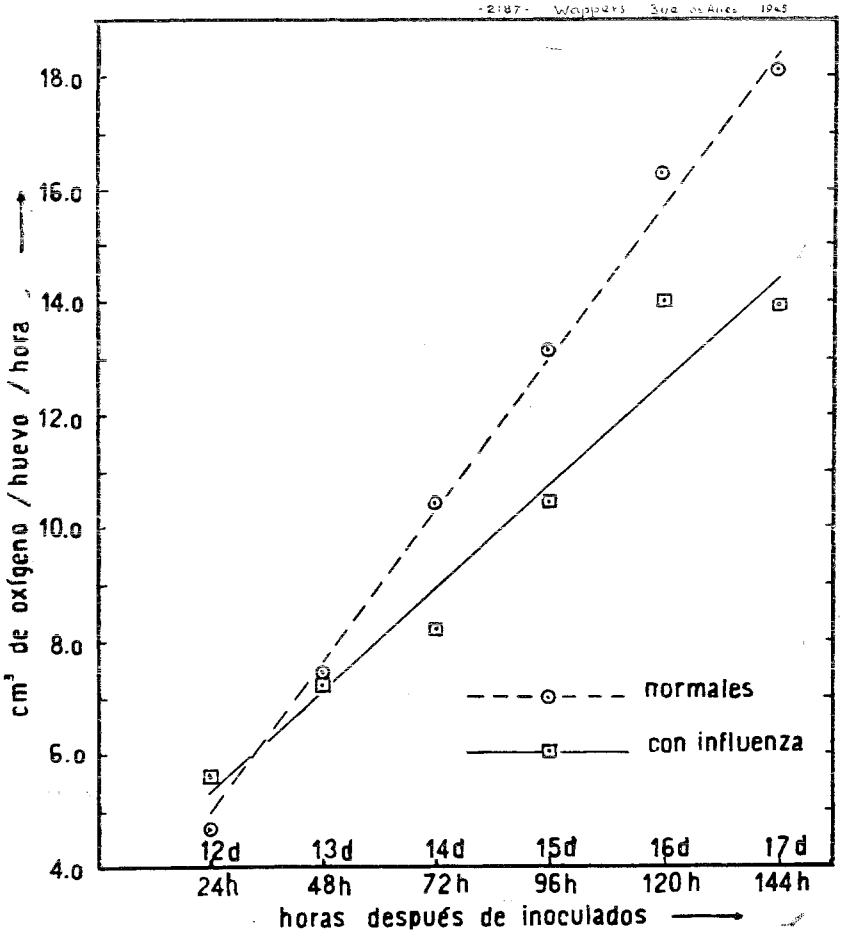

18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
cm³ de oxígeno / huevo / hora
normales
con influenza
12d
13d
14d
15d
16d
17d
24h
48h
72h
96h
120h
144h
horas después de inoculados

Figura Nº 4

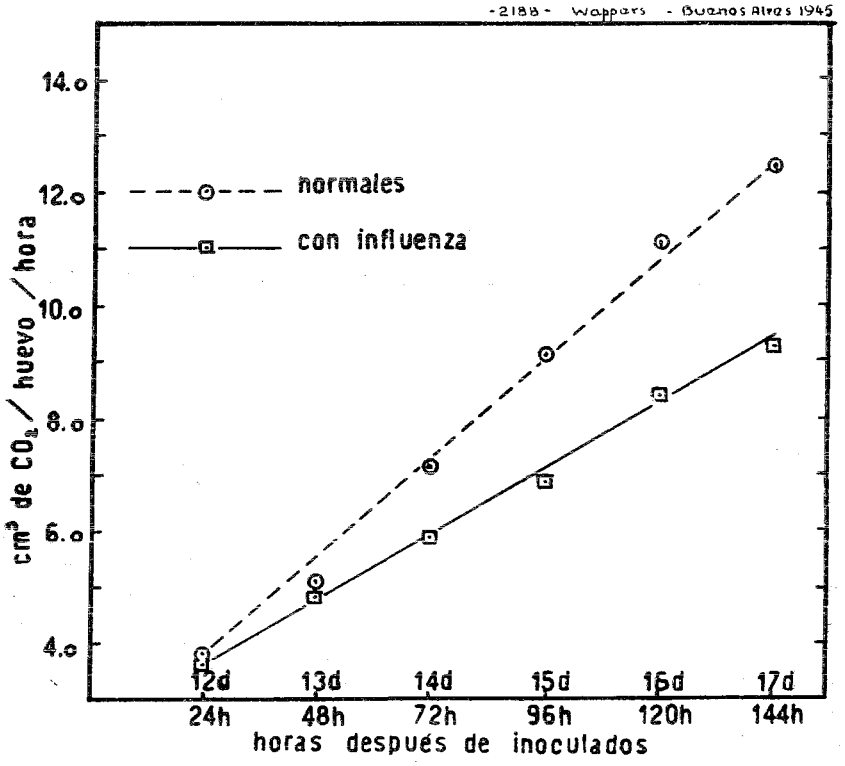


Figura Nº 5

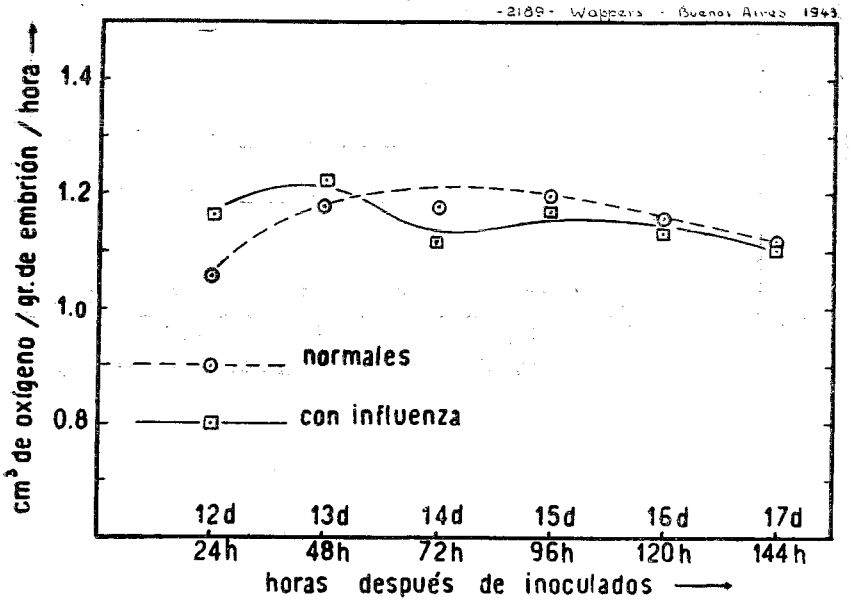


Figura Nº 6

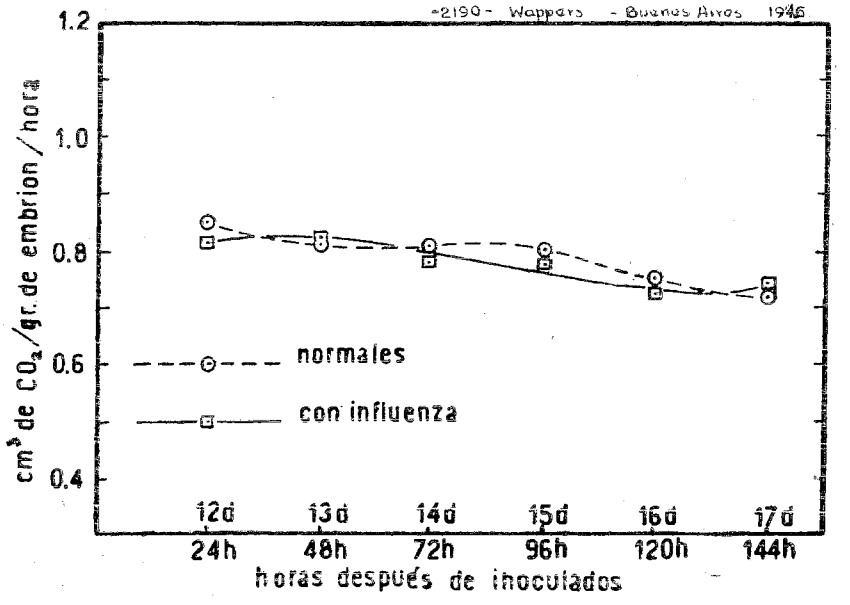
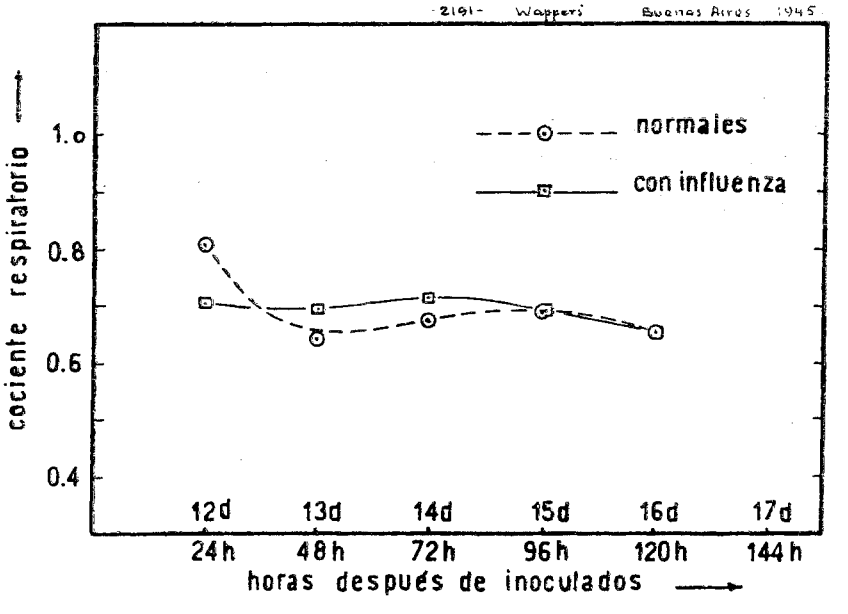


Figura Nº 7



Si estos resultados se refieren a gramo de embrión húmedo (para peso de embriones véase trabajo Nº IV de esta serie (4)), se observa que no hay diferencias significativas ni en el consumo de oxígeno ni en la producción de anhidrido carbónico entre huevos normales o inoculados con virus a lo largo de todo el experimento (figura Nº 5 y 6). Consecuentemente tampoco se observan diferencias en los cocientes respiratorios (figura Nº 7). De acuerdo a lo señalado al comienzo es probable que éstos sean, en valor absolutos, un poco altos.

Una posible excepción es el valor relativo al consumo de oxígeno por gramo de emrión a las 24 horas, en el cual la diferencia de los promedios, si bien no llega a ser "significativa" de acuerdo al criterio adoptado ($P < 0{,}05$) justificaría en cambio la realización de nuevas experiencias para su dilucidación definitiva.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la inoculación del virus "A" de influenza provoca una disminución general del intercambio gaseoso, proporcional a la disminución de peso de los embriones, sin una modificación substancial del tipo de substancias quemadas (igualdad de los coeficientes respiratorios) y que el ritmo de ese retardo se mantiene aún después que la mayor parte del virus a desaparecido (véase figura Nº 1 de (1)).

Una discusión más completa de estos resultados se hará al final de la parte IV de esta serie de trabajos.

BIBLIOGRAFÍA

1. PENNIMPEDE F. C., PARODI A. S., LAJMANOVCH S. y MITTELMAN N. — (En prensa).
2. NEEDHAM J. — "Chemical Embriology", **2**.
3. MURRAV H. A. — J. Gen. Physiol, **9**, 1, 1925.
4. PARODI A. S., PENNIMPEDE F. C. LAJMANOVICH S. y MITTELMAN N. — (En prensa).