Cambios producidos en el hemograma y mielograma de los embriones de pollo infectados con virus "A" de influenza

Por FRANCISCO C. PENNIMPEDE *

En trabajos anteriores [1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7] se han estudiado las diversas modificaciones, ponderales y metabólicas, del huevo de gallina en desarrollo cuando es inoculado con virus A de influenza y fué estudiada también la composición de elementos nitrogenados [8] en el líquido alantoideo. Los hallazgos realizados nos impusieron de la necesidad de conocer el alcance de las alteraciones ocasionadas a los embriones de pollo por la infección con virus A de influenza.

Nuestro primer objetivo fué, llevar la investigación sobre los posibles disturbios en la composición celular de la sangre periférica y en un órgano hematopoiético accesible, en nuestro caso escogimos la médula ósea de los huesos largos. La escasez de publicaciones sobre estos tópicos y la insuficiencia de las existentes, nos obligaron a estudiar, en los embriones de pollo, los citogramas de la sangre periférica y de la médula ósea.[9]

En esta comunicación, presentamos nuestras experiencias sobre embriones normales e infectados con virus A de influenza, reveladoras de la intervención que tiene en la patogenia de las alteraciones hematológicas observadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ya fueron descriptos en nuestro trabajo anterior [9], pero: la mitad de los huevos fué inoculada en la cavidad alantoidea, a los 11 días de incubación, con 0.1 ml. de una dilución 10^{-4} de virus A de influenza, cepa 7 [10] (líquido alantoideo) en solución fisiológica adicionada de penicilina G.

La investigación hematológica se practicó cada 24 horas sobre huevos normales e infectados en uno o dos de cada grupo. Se com-

* De la sección Virus del Instituto Bacteriológico "Malbrán".

NOTA. En todos los gráficos el primer punto corresponde al 11º día de los embriones normales [9].

Presentado en la reunión de comunicaciones del 28 de septiembre de 1948.

probó la infección de los huevos con el virus, por la presencia de hemoaglutininas para los glóbulos rojos de pollo.[11]

Estadística.

Desviación standard: se utilizó la fórmula:

$$\sigma = \sqrt{\frac{E\ (d)^2}{N - 1}}$$

Se estudiaron las diferencias por el método de "Student".

$$s = \sqrt{\frac{E\ (d-\bar{d})^2}{N - 1}} \quad y\ t = \frac{\bar{d}}{S/N}$$

Buscándose el valor de "p" en la tabla de "t" de "Student". transcripta por Udny Yule y Kendall [12].

s = desviación standard de las diferencias entre normales e infectados.

$\bar{d}$ = medida (cantidad o porciento) en que los elementos celulares de un grupo de huevos infectados, se aparta de los elementos celulares de otro grupo igual estudiado simultáneamente pero sin inocular.

$\bar{d}$ = promedio de las desviaciones (d) en el total de los huevos que constituyen una serie de experiencias.

E = sumación.

E $(d - \bar{d})^2$ = suma de los cuadrados de las diferencias entre d y $\bar{d}$. Se entiende que d varía en cada grupo estudiado y $\bar{d}$ es constante para todo el grupo, puesto que es su promedio.

p = probabilidad de que una diferencia de magnitud igual o mayor, ocurra en un experimento análogo, pero con idéntico proceder en ambos grupos de huevos.

Se considera significativa toda diferencia cuyo $p \leqq 0.05$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. SANGRE PERIFÉRICA. (Cuadro 1)

a) *Cantidad de hematies y de hemoglobina.*

Durante el curso de la experimentación, la cantidad promedio de hematies en los embriones infectados (excepto de las 72 horas de la inoculación donde los valores son semejantes) fué inferior a la registrada para los normales. Las variaciones individuales observadas no permiten asignar significación estadística a las diferencias exis-

tentes entre ambos grupos de embriones, normales e infectados. Gráfico 1.

La concentración hemoglobínica de la sangre de los embriones infectados, guarda respecto de la correspondiente a los embriones normales, la misma relación que entre los glóbulos de los dos grupos y con la misma excepción a las 72 horas de inoculados con virus. Las diferencias existentes entre ambos grupos, en su contenido de hemoglobina, es estadísticamente significativo a las 48, 96 y 120 ho-

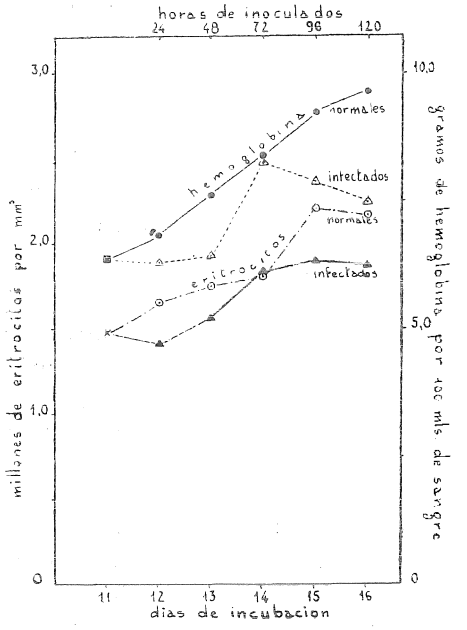

GRÁFICO 1.

ras. En esta última el desnivel entre los dos grupos es máximo. Gráfico 1.

La reducción del contenido celular y hemoglobínico en la sangre de los embriones infectados, destaca la anemia provocada por la infección viral y lógicamente su influencia en el desarrollo del embrión y sus anexos (1, 5, 6 y 7).

b) *Hemograma.*

Es, en el citograma, donde se manifiesta la profundidad de los transtornos en la composición porcentual de las diversas células, como así también las distintas alteraciones cualitativas y citológicas.

Los porcentajes celulares, sus desviaciones standard y el valor de las diferencias encontradas se exponen en el Cuadro 1.

Consideraremos cada elemento en particular y a continuación analizaremos lo acontecido a la serie correspondiente.

Serie roja primitiva.

La infección con virus, parece afectar profundamente la evolución de estas células. En los embriones normales no se han observado megaloblastos, en tanto, éstos aparecen en los infectados desde las 48 a las 96 horas de inoculados. Los megalocitos policromatófilos, siempre predominaron en los infectados, y los ortocromáticos menguaron 6,4 veces en los normales, mientras en los infectados sólo 2,5 veces. La diferencia notable en las dos series, a partir de las 48 horas del inóculo, recién es estadísticamente significativa a las 120 horas.

Todo retardo en la desaparición de estas células, tiene lógicamente su respuesta en la menor cantidad de elementos rojos definitivos, desde que el incremento de éstos, se hace en detrimento de aquéllas. Gráfico 2.

Serie roja definitiva.

Dentro de esta serie, es donde las distintas células integrantes muestran las más variadas modificaciones, ya sea en cuanto a la diversidad de tipos, en cuanto a su número o respecto a las alteraciones citoplasmáticas que muestran como resultado, presumiblemente de la acción selectiva ejercida por el virus sobre ellas. Comenzaremos por la variación de tipos y de número. En la sangre de los embriones infectados, aparecen en circulación proeritroblastos hasta las 96 horas posteriores a la inoculación, no observándose estas células en los embriones normales, sino en un sólo caso a los 16 días, correspondiéndole a las 120 horas de inoculación de los infectados, en ninguno de los cuales en ese momento fueron hallados. En todos los días existe un evidente predominio de eritroblastos basófilos en los embriones infectados, otro tanto acontece con los eritroblastos policromáticos en proporción significativa a las 24 y 96 horas, estando en el límite de la significación a las 72 horas, nivelándose los valores a las 48 y 120 horas. Los eritrocitos policromáticos se presentan en cantidades mayores en los embriones normales hasta el 14º día (72 horas de inoculación de los infectados) siendo significativa esta diferencia a las 48 horas. Luego (15º y 16º día) los valores se invierten y resultan mayores para esta célula en los embriones infectados. Referente a los eritrocitos adultos (ortocromáticos), en ambos grupos de embriones y durante todo el curso de la observación, se conserva con ligeras oscilaciones, suficientemente uniformes.

La serie roja definitiva en conjunto, muestra un desnivel progresivo entre los embriones normales e infectados, favorable a los pri-

CUADRO 1

HEMOGRAMAS

Días de incubación	12		
	Normales	Infectados	
Horas de inoculados	—	24	
Número de embriones	4	4	
	M ± σ	M ± σ	p.
Eritrocitos en millones por mm³.	1.658 ± 0,396	1.4175 ± 0.390	0.28
Hemoglobina grs. %	6.64 ± 0.66	6.33 ± 0.36	0.072
HEMOGRAMA-células %			
Serie roja primitiva			
Megaloblastos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Megalocitos policromáticos	0.124 ± 0.227	0.23 ± 0.36	0.34
Megalocitos ortocromáticos	8.65 ± 4.73	8.56 ± 4.15	0.14
Total	8.774 ± 5.12	8.77 ± 4.33	0.19
Serie roja definitiva			
Proeritroblastos	0.00 ± 0.00	0.0025 ± 0.005	+
Eritroblastos basófilos	0.139 ± 0.24	0.195 ± 0.20	0.13
Eritroblastos policromáticos	10.31 ± 2.35	14.37 ± 3.58	0.012
Eritrocitos policromáticos	26.95 ± 4.46	24.59 ± 8.23	0.70
Eritrocitos ortocromáticos	53.78 ± 9.45	52.00 ± 10.22	0.85
Total	9.18 ± 5.41	91.16 ± 4.31	0.99
Serie mieloide			
Mieloblastos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Promielocitos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Mielocitos	0.00 ± 0.00	0.0025 ± 0.005	+
Metamielocitos	0.00 ± 0.00	0.0075 ± 0.005	+
Granulocitos heterófilos	0.045 ± 0.042	0.06 ± 0.06	0.47
Granulocitos eosinófilos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Granulocitos basófilos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Total	0.045 ± 0.042	0.07 ± 0.05	0.17
Linfocitos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Monocitos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Mitosis %	0.007 ± 0.005	0.022 ± 0.005	0.058

M = Promedio.

σ = Desviación standard.

(Continúa)

CUADRO 1 *(Continuación)*

HEMOGRAMAS

Días de incubación	13		
	Normales	Infectados	
Horas de inoculados	—	48	
Número de embriones	6	6	
	M ± σ	M ± σ	p.
Eritrocitos en millones de mm³.	1.757± 0.196	1.563± 0.201	0.076
Hemoglobina grs. %	7.62 ± 0.79	6.43 ± 0.49	0.042
HEMOGRAMA-células %			
Serie roja primitiva			
Megaloblastos	0.00 ± 0.00	0.043± 0.03	+
Megalocitos policromáticos	0.0117±0.0018	0.1316±0.11	0.050
Megalocitos ortocromáticos	4.07 ± 1.18	4.26 ±1.02	0.69
Total	4.08 ± 1.18	4.44 ± 1.06	0.49
Serie roja definitiva			
Proeritroblastos	0.00 ± 0.00	0.061± 0.031	+
Eritroblastos basófilos	0.08 ± 0.15	0.83 ± 1.26	2.15
Eritroblastos policromáticos	15.96 ± 6.26	15.98 ± 2.80	0.99
Eritrocitos policromáticos	27.52 ± 3.49	21.98 ± 4.49	0.048
Eritrocitos ortocromáticos	52.32 ± 4.45	56.44 ± 4.88	0.10
Total	95.875± 1.20	95.29 ± 1.16	0.26
Serie mieloide			
Mieloblastos	0.00 ± 0.00	0.0316±0.047	+
Promielocitos	0.00 ± 0.00	0.0283±0.034	+
Mielocitos	0.00 ± 0.00	0.031 ±0.039	+
Metamielocitos	0.0017±0.004	0.0675±0.068	0.07
Granulocitos heterófilos	0.0433±0.05	0.1083±0.111	0.075
Granulocitos eosinófilos	0.00 ± 0.00	0.0016±0.0042	+
Granulocitos basófilos	0.00 ± 0.00	0.0016±0.0042	+
Total	0.043± 0.057	0.27 ± 0.23	0.052
Linfocitos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Monocitos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Mitosis %	0.007± 0.052	0.085± 0.032	< 0.001

M = Promedio.

σ = Desviación standard.

(Continúa

CUADRO 1 *(Continuación)*

HEMOGRAMAS

Días de incubación	14		
	Normales	Infectados	
Horas de inoculados	—	72	
Número de embriones	6	6	
	M ± σ	M ± σ	p.
Eritrocitos en millones de mm³.	1.8125±0.130	1.835± 0.166	0.83
Hemoglobina grs. %	8.38 ± 0.58	8.27 ± 0.66	0.77
HEMOGRAMA-células %			
Serie roja primitiva			
Megaloblastos	0.00 ± 0.00	0.005±0.0058	+
Megalocitos policromáticos	0.028± 0.036	0.11 ± 0.098	0.13
Megalocitos ortocromáticos	2.99 ± 0.80	3.73 ± 1.09	0.34
Total	3.02 ± 0.83	3.90 ± 1.04	0.65
Serie roja definitiva			
Proeritroblastos	0.00 ± 0.00	0.003± 0.005	+
Eritroblastos basófilos	0.037± 0.05	0.07 ± 0.048	0.38
Eritroblastos policromáticos	12.38 ± 3.70	15.31 ± 2.16	0.054
Eritrocitos policromáticos	20.33 ± 4.88	15.02 ± 2.84	0.20
Eritrocitos ortocromáticos	64.18 ± 5.63	64.71 ± 3.50	0.85
Total	96.93 ± 0.82	95.92 ± 1.18	0.25
Serie mieloide			
Mieloblastos	0.00 ± 0.00	0.005± 0.007	+
Promielocitos	0.00 ± 0.00	0.015± 0.015	+
Mielocitos	0.0017±0.004	0.0175±0.054	+
Metamielocitos	0.0033±0.005	0.0425±0.024	0.018
Granulocitos heterófilos	0.04 ± 0.03	0.0916±0.0828	0.29
Granulocitos eosinófilos	0.00 ± 0.00	0.005± 0.005	0.042
Granulocitos basófilos	0.00 ± 0.00	0.0016±0.004	+
Total	0.045± 0.078	0.18 ± 0.11	0.066
Linfocitos	0.00 ± 0.00	0.0033±0.0032	+
Monocitos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Mitosis %	0.008±0.0204	0.022± 0.006	0.042

M = Promedio.

σ = Desviación standard.

(Continúa)

CUADRO 1 *(Continuación)*

HEMOGRAMAS

Días de incubación	15		
	Normales	Infectados	
Horas de inoculados	—	96	
Número de embriones	5	5	
	M ± σ	M ± σ	p.
Eritrocitos en millones de mm³.	2.205± 0.242	1.8934×0.238	0.13
Hemoglobina grs. %	9.21 ± 0.92	7.89 ± 0.34	0.012
HEMOGRAMA-células %			
Serie roja primitiva			
Megaloblastos	0.00 ± 0.00	0.002±0.0045	+
Megalocitos policromáticos	0.022± 0.018	0.031± 0.019	0.49
Megalocitos ortocromáticos	2.20 ± 1.73	3.19 ± 0.76	0.32
Total	2.23 ± 1.73	3.22 ± 0.83	0.29
Serie roja definitiva			
Proeritroblastos	0.00 ± 0.00	0.004±0.0055	+
Eritroblastos basófilos	0.024± 0.03	0.038± 0.040	0.54
Eritroblastos policromáticos	11.42 ± 1.55	14.80 ± 3.26	0.02
Eritrocitos policromáticos	18.50 ± 1.66	21.25 ± 3.07	0.14
Eritrocitos ortocromáticos	67.79 ± 4.06	60.40 ± 4.31	0.06
Total	97.74 ± 1.72	96.49 ± 1.05	0.22
Serie mieloide			
Mieloblastos	0.00 ± 0.00	0.004± 0.09	+
Promielocitos	0.00 ± 0.00	0.019± 0.019	+
Mielocitos	0.00 ± 0.00	0.034±0.0116	+
Metamielocitos	0.00 ± 0.00	0.035± 0.024	+
Granulocitos heterófilos	0.026± 0.025	0.126± 0.115	0.074
Granulocitos eosinófilos	0.002± 0.004	0.012± 0.013	0.18
Granulocitos basófilos	0.00 ± 0.00	0.004± 0.008	0.31
Total	0.028± 0.024	0.237± 0.16	0.054
Linfocitos	0.002± 0.004	0.038±0.0795	0.32
Monocitos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Mitosis %	0.004± 0.009	0.042± 0.082	0.022

M = Promedio.

σ = Desviación standard.

(Continúa)

CUADRO 1 *(Continuación)*

HEMOGRAMAS

Días de incubación	16		
	Normales	Infectados	
Horas de inoculados	—	120	
Número de embriones	4	4	
	M ± σ	M ± σ	p.
Eritrocitos en millones de mm³.	2.1775±0.312	1.8766×0.318	0.092
Hemoglobina grs. %	9.65 ± 0.82	7.48 ± 0.47	0.020
HEMOGRAMA-células %			
Serie roja primitiva			
Megaloblastos	0.00 ±?0.00	0.00 ± 0.00	—
Megalocitos policromáticos	0.0075±0.005	0.125± 0.145	0.20
Megalocitos ortocromáticos	1.37 ± 0.40	3.30 ± 0.47	0.17
Total	1.37 ± 0.63	3.42 ± 0.50	0.010
Serie roja definitiva			
Proeritroblastos	0.0052±0.0105	0.00 ± 0.00	—
Eritroblastos basófilos	0.065± 0.12	0.01 ± 0.014	0.45
Eritroblastos policromáticos	8.58 ± 2.75	6.41 ± 1.85	0.26
Eritrocitos policromáticos	18.59 ±1 0.86	22.42 ± 9.22	0.44
Eritrocitos ortocromáticos	71.31 ± 2.98	67.24 ±10.42	0.49
Total	98.56 ± 0.49	96.08 ± 0.59	0.010
Serie mieloide			
Mieloblastos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Promielocitos	0.00 ± 0.00	0.0025±0.005	+
Mielocitos	0.002±0.0024	0.0187±0.0063	0.028
Metamielocitos	0.0035±0.0047	0.096±0.0718	0.11
Granulocitos heterófilos	0.054± 0.022	0.354±0.0731	0.001
Granulocitos eosinófilos	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Granulocitos basófilos	0.0012±0.0023	0.0025±0.005	0.71
Total	0.061 ±0.056	0.47 ± 0.089	<< 0.001
Linfocitos	0.0037±0.0075	0.018±0.0096	0.14
Monocitos	0.00 ± 0.00	0.0075±0.0095	+
Mitosis %	0.005±0.0058	0.007± 0.002	0.38

M = Promedio.

σ = Desviación standard.

meros y estadísticamente significativo a los 16 días de incubación (120 horas de inoculados con virus). Gráfico 2.

Hemos anticipado que las células de la serie eritrocítica, manifestaban su ataque por el virus, presentando alteraciones citoplasmáticas. En efecto, como hecho corriente y sin excepción alguna, en nuestras experiencias, en las células eritrocíticas de los embriones infectados y a partir de las 48 horas de la inoculación, se presentaron con una modificación citoplasmática particularmente llamativa, la

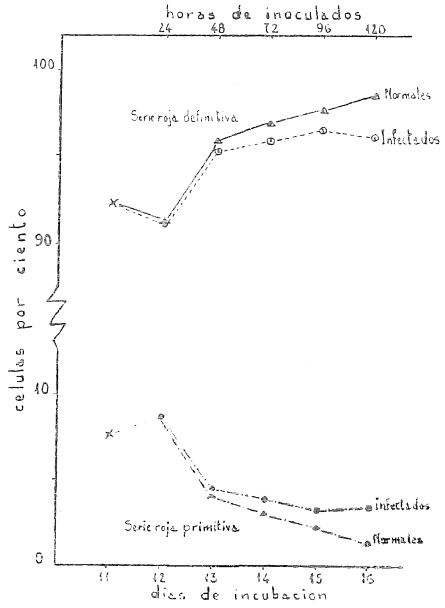

GRÁFICO 2.

presencia de "vacuolas" (Figs. 1 y 2). Se excluyeron todas las causas que podían infundir sospechas de un artificio de técnica; además se inoculó un lote de embriones con el mismo diluyente del virus prolongándose la observación hasta las 120 horas, no señalándose lo mismo que en los frotis de los embriones normales, la existencia de "vacuolas".

Las células de esta serie que mostraron esta particularidad, llamaron la atención por presentar de una a cinco "vacuolas" una al lado de otra, iguales o de tamaño diferente, otras con "vacuolas" confluentes, o una grande que deformaba el citoplasma y desplazaba hacia un extremo al núcleo. En el Cuadro 2 se muestra el porcentaje de células de la serie y la proporción de las mismas que contenían "vacuolas". En este cuadro se ve que son las células más jóvenes las más frecuentemente provistas de estas "vacuolas", lo cual

CUADRO 2

PORCENTAJE DE CÉLULAS CON VACUOLAS OBSERVADAS EN LA SERIE ROJA DEFINITIVA

Horas de inoculados	48		72	
	Células %	Células con vacuolas %	Células %	Células con vacuolas %
	M ± σ	M ± σ	M ± σ	M ± σ
Eritroblastos basófilos	0.83 ± 1.26	0.17 ± 0.23	0.07 ± 0.048	0.00 ± 0.00
Eritroblastos policromáticos ..	15.98 ± 2.80	3.95 ± 2.59	15.31 ± 2.16	3.13 ± 1.38
Eritrocitos policromáticos .	21.98 ± 4.49	4.04 ± 2.08	15.82 ± 2.84	1.96 ± 1.12
Eritrocitos ortocromáticos.	56.44 ± 4.88	2.07 ± 1.53	64.71 ± 3.50	0.80 ± 0.48
Total	95.23 ± 1.16	10.25 ± 5.96	95.92 ± 1.18	5.89 ± 2.43

Horas de inoculados	96		120	
	Células %	Células con vacuolas %	Células %	Células con vacuolas %
Eritroblastos basófilos	0.038 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.014	0.00 ± 0.00
Eritroblastos policromáticos ..	14.80 ± 3.26	3.75 ± 1.08	6.41 ± 1.85	1.23 ± 0.64
Eritrocitos policromáticos .	21.25 ± 3.07	2.71 ± 1.12	22.42 ± 9.22	2.80 ± 2.01
Eritrocitos ortocromáticos.	60.40 ± 4.31	1.34 ± 0.74	67.24 ± 10.42	1.63 ± 1.55
Total	96.49 ± 1.05	7.80 ± 2.00	96.08 ± 0.50	5.66 ± 2.72

nos lleva a conjeturar que las "vacuolas" se inician en las células inmaduras (eritroblastos) y persisten hasta el completo desarrollo y maduración del eritrocito. Entre el 13º día (48 horas de la inoculación) y el 16º se ha reducido el número de células "vacuoladas" en un 50 %.

Actualmente estamos estudiando el significado y razón de estas vacuolas; si son una manifestación viral, alterando la estructura de la célula eritrocítica, o son el virus mismo parasitando las células, o éstas han perdido sus características físicas y se presentan alteradas por las modificaciones del medio (plasma), etc., trataremos de

elucidarlo con las experiencias que están en marcha. Por ahora consignamos este hecho, "per se" lo suficiente elocuente para despertar interés en buscarle una explicación.

Serie mieloide. (Gráfico 3)

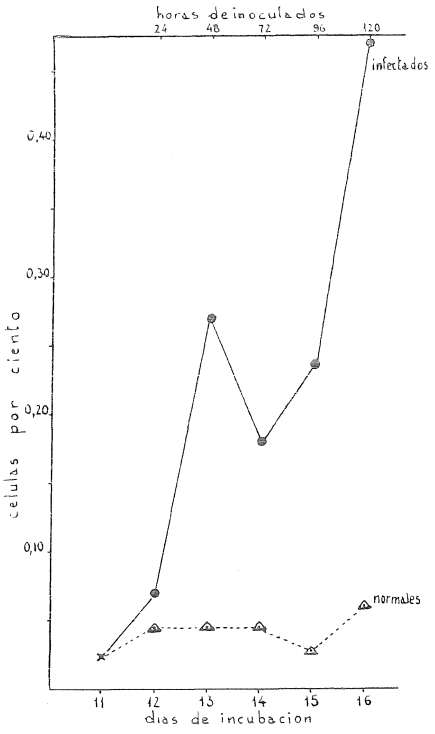

GRÁFICO 3.

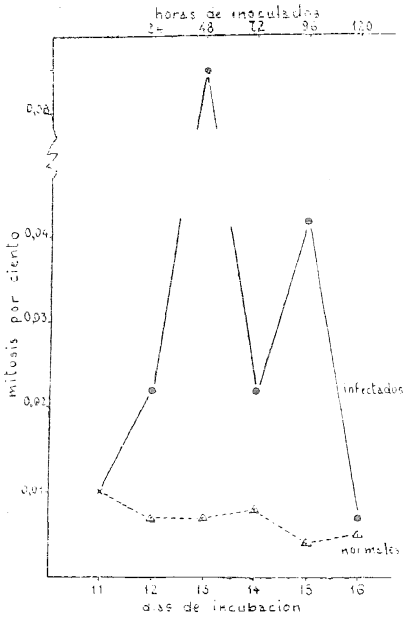

GRÁFICO 4.

Un mayor número de leucocitos entran en la circulación (células inmaduras y maduras), indudablemente por la infección virus. En este sentido, ocurre con los embriones de pollo, el mismo fenómeno de observación corriente en los animales de experimentación, cuando son inoculados con un agente infectante, los cuales presentan leucocitosis.

Mientras en los embriones normales, aparecen en círculo, metamielocitos desde el 13º día y mielocitos en el 15º y 16º días de incubación, y una pequeña cantidad de granulocitos maduros, prácticamente invariable durante toda la experimentación, que configuran una cantidad también constante para la serie, en la sangre de los embriones infectados se presenta una marcada leucocitosis. Esta leucocitosis es muy precoz, notándose ya a las 24 horas, con la aparición de mielocitos, metamielocitos y un porciento más elevado de

granulocitos. Este vuelco de elementos a la circulación aumenta desde las 48 horas de la inoculación en que aparecen además, células muy inmaduras (mieloblastos y promielocitos), este aumento se mantiene en el límite de la significación hasta las 96 horas y es altamente significativo a las 120 horas, respecto de las cifras apuntadas por el grupo de las células mieloides normales. La significación individual está dada en la mayoría de los casos, por la presencia de determinadas células en el grupo de embriones infectados y su ausencia en el grupo de los normales. Aun en el caso de células presentes en ambos grupos, siempre fué superior el número que presentó la sangre de los embriones infectados, y a veces con valor estadístico.

Debemos señalar, que los granulocitos fueron quienes aumentaron constantemente, llegando a sobrepasar en 6 veces el número correspondiente de los registrados en los embriones normales, a las 120 horas de infección, momento en el cual la diferencia es muy significativa.

Linfocitos.

En los embriones normales se señalaron a los 15º y 16º días, en cambio en los infectados ya desde el 14º día y en mucho mayor cantidad.

Monocitos.

Se presentaron únicamente en los embriones infectados a las 120 horas de la inoculación.

Mitosis. (Gráfico 4)

La diferente actividad cariocinética en ambos grupos (normales e infectados), tiene su reflejo en el significado estadístico, ya desde las 48 horas en adelante. A las 24 horas, si bien las mitosis son más numerosas en los infectados, la diferencia está en el límite de la significación.

II. MÉDULA ÓSEA. (*Mielograma*). Ver Cuadro 3

Si en la sangre periférica, como se vió más arriba en virus de influenza imprime variaciones cualicuantitativas de los elementos citológicos constituyentes, es lógico suponer y así ocurre, que en la médula ósea las modificaciones ocasionadas sean tan o más intensas, en razón de su función hemocitopoietica. Todo cambio observado en el citograma de la sangre periférica, tiene sin duda su origen en los centros hemocitopoieticos, pues aquélla es el reflejo del estado de éstos.

Analizaremos las desviaciones del mielograma, con el mismo criterio adoptado para el hemograma.

Serie roja primitiva. (Gráfico 5)

A las 24 horas de la inoculación, es significativa la diferencia en menos presentada por los megalocitos policromáticos. Aparte de este hecho cada elemento en particular y todo el grupo no ofrecen desviaciones apreciables durante los días estudiados.

Serie roja definitiva. (Gráfico 5)

Los proeritroblastos, en los dos lotes, decrecen en forma similar, pero en algo más los infectados a las 72 y 120 horas de la inoculación. El porciento de eritroblastos basófilos en los infectados, aumenta su

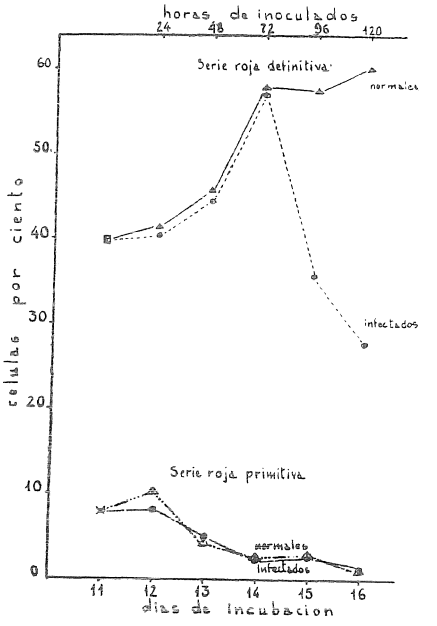

GRÁFICO 5.

diferencia con los testigos de las 24 a las 48 horas, cuando adquiere significación, luego en los infectados se reducen en tanto los normales aumentan.

Iguales en proporción, a las 24 horas son predominantes a las 48 horas los eritroblastos policromatófilos en los embriones infectados, después se invierten las relaciones y son los normales los favorecidos por las diferencias significativas a las 96 horas.

Los valores registrados para los eritrocitos policromáticos, fueron inferiores en la médula ósea de los embriones infectados, a partir de las 48 horas del inóculo, pero la diferencia fué significativa hasta las 96 horas. Los eritrocitos ortocromáticos, dominaron siempre en los normales, con diferencia significativa a las 96 horas.

CUADRO 3

MIELOGRAMAS

Días de incubación	12		
	Normales	Infectados	
Horas de inoculados	—	24	
Número de embriones	4	4	
	M ± σ %	M ± σ %	p.
Serie roja primitiva			
Megaloblastos	1.46 ± 1.50	1.73 ± 2.33	0.68
Megalocitos policromáticos	1.48 ± 0.92	0.35 ± 0.36	0.004
Megalocitos ortocromáticos	7.41 ± 4.56	5.49 ± 3.04	0.42
Total	10.16 ± 5.06	8.07 ± 6.12	0.55
Serie roja definitiva			
Procritroblastos	2.40 ± 1.91	1.59 ± 1.18	0.46
Eritroblastos basófilos	5.53 ± 1.57	6.51 ± 3.20	0.65
Eritroblastos policromáticos	8.44 ± 1.39	8.89 ± 5.39	0.91
Eritrocitos policromáticos	7.64 ± 4.37	8.79 ± 3.13	0.33
Eritrocitos ortocromáticos	17.29 ± 7.62	14.56 ± 5.35	0.54
Total	41.31 ± 9.93	40.34 ± 10.64	0.89
Células poco diferenciadas			
Histiocitos	16.47 ± 8.85	18.84 ± 8.25	0.73
Hemocitoblastos	7.17 ± 9.68	5.90 ± 4.15	0.49
Total	23.64 ± 12.27	24.74 ± 11.33	0.89
Serie mieloide			
Mieloblastos	7.19 ± 6.40	6.13 ± 4.32	0.47
Promielocitos	4.52 ± 3.12	2.84 ± 2.65	0.13
Mielocitos heterófilos	1.46 ± 0.50	2.79 ± 1.72	0.30
Mielocitos eosinófilos	0.19 ± 0.38	0.00 ± 0.00	0.39
Mielocitos basófilos	0.24 ± 0.27	0.83 ± 0.56	0.11
Total	13.59 ± 9.65	12.57 ± 8.51	0.70
Metamielocitos heterófilos	2.45 ± 1.35	3.94 ± 3.49	0.31
Metamielocitos eosinófilos	0.000 ± 0.00	0.00 ± 0.00	—
Granulocitos heterófilos	6.96 ± 5.13	7.83 ± 6.66	0.57
Granulocitos eosinófilos	0.23 ± 0.27	0.09 ± 0.18	0.27
Granulocitos basófilos	0.11 ± 0.23	0.00 ± 0.00	0.39
Total	9.76 ± 6.27	11.86 ± 12.51	0.47
Total mieloides	23.35 ± 10.03	24.44 ± 12.05	0.83
Osteoclastos	1.54 ± 0.46	2.41 ± 0.35	0.028
Mitosis	2.24 ± 0.97	3.30 ± 1.72	0.32

M = Promedio.
σ = Desviación standard.

(Continúa)

CUADRO 3 *(Continuación)*

MIELOGRAMAS

Días de incubación	13		
	Normales	Infectados	
Horas de inoculados	—	48	
Número de embriones	6	6	
	M ± σ %	M ± σ %	p.
Serie roja primitiva			
Megaloblastos	0.44 ± 0.39	1.24 ± 1.97	0.31
Megalocitos policromáticos	0.61 ± 0.66	0.86 ± 0.77	0.60
Megalocitos ortocromáticos	3.49 ± 1.08	2.67 ± 1.82	0.24
Total	4.54 ± 1.96	4.78 ± 4.24	0.90
Serie roja definitiva			
Proeritroblastos	1.32 ± 0.58	1.83 ± 1.34	0.34
Eritroblastos basófilos	4.65 ± 1.60	8.26 ± 2.66	< 0.001
Eritroblastos policromáticos	9.58 ± 8.07	14.47 ± 7.87	0.19
Eritrocitos policromáticos	11.22 ± 4.26	6.03 ± 1.02	0.022
Eritrocitos ortocromáticos	18.95 ± 6.95	13.81 ± 3.76	0.17
Total	45.72 ± 13.71	44.41 ± 7.16	0.70
Células poco diferenciadas			
Histiocitos	17.10 ± 11.09	10.45 ± 9.20	0.008
Hemocitoblastos	5.51 ± 2.38	6.16 ± 2.00	0.65
Total	22.61 ± 11.08	16.61 ± 7.40	0.012
Serie mieloide			
Mieloblastos	8.26 ± 4.72	11.53 ± 5.20	0.001
Promielocitos	6.46 ± 3.48	8.40 ± 4.30	0.34
Mielocitos heterófilos	2.48 ± 1.74	6.72 ± 1.54	< 0.001
Mielocitos eosinófilos	0.08 ± 0.19	0.25 ± 0.29	0.34
Mielocitos basófilos	1.43 ± 0.94	0.46 ± 0.63	0.030
Total	18.72 ± 9.70	27.37 ± 5.55	0.014
Metamielocitos heterófilos	1.18 ± 0.59	3.24 ± 1.71	0.032
Metamielocitos eosinófilos	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.23	0.36
Granulocitos heterófilos	5.64 ± 5.43	2.44 ± 1.67	0.12
Granulocitos eosinófilos	0.06 ± 0.16	0.00 ± 0.00	0.36
Granulocitos basófilos	0.30 ± 0.24	0.07 ± 0.18	0.052
Total	7.19 ± 5.81	5.84 ± 3.14	0.62
Total mieloide	25.90 ± 13.79	33.20 ± 5.94	0.16
Osteoclastos	1.22 ± 0.54	0.99 ± 0.45	0.52
Mitosis	2.85 ± 1.46	2.88 ± 0.63	0.97

M = Promedio.
σ = Desviación standard.

(Continúa)

CUADRO 3 *(Continuación)*

MIELOGRAMAS

Días de incubación	14		
	Normales	Infectados	
Horas de inoculados	—	72	
Número de embriones	6	6	
	M ± σ %	M ± σ %	p
Serie roja primitiva			
Megaloblastos	0.60 ± 0.89	0.52 ± 0.80	0.77
Megalocitos policromáticos	0.54 ± 0.52	0.46 ± 0.79	0.57
Megalocitos ortocromáticos	1.55 ± 0.60	1.53 ± 1.66	0.98
Total	2.69 ± 1.76	2.51 ± 2.41	0.90
Serie roja definitiva			
Proeritroblastos	1.79 ± 1.51	0.72 ± 0.45	0.082
Eritroblastos basófilos	5.48 ± 2.01	3.40 ± 2.69	0.17
Eritroblastos policromáticos	19.79 ± 7.76	12.61 ± 6.38	0.12
Eritrocitos policromáticos	9.51 ± 1.92	7.62 ± 2.22	0.046
Eritrocitos ortocromáticos	21.41 ± 10.34	12.94 ± 7.68	0.10
Total	57.99 ± 14.59	57.29 ± 13.71	0.022
Células poco diferenciadas			
Histiocitos	11.03 ± 7.31	7.53 ± 3.65	0.21
Hemocitoblastos	6.77 ± 1.53	7.20 ± 0.99	0.50
Total	17.81 ± 7.59	14.73 ± 4.74	0.37
Serie mieloide			
Mieloblastos	3.89 ± 1.42	12.77 ± 5.20	0.020
Promielocitos	3.62 ± 2.34	9.94 ± 2.22	0.010
Mielocitos heterófilos	3.84 ± 1.41	9.32 ± 3.88	0.032
Mielocitos eosinófilos	0.00 ± 0.00	0.47 ± 0.41	0.032
Mielocitos basófilos	0.90 ± 0.46	0.68 ± 0.53	0.54
Total	12.24 ± 4.60	33.19 ± 8.47	0.010
Metamielocitos heterófilos	0.89 ± 0.63	5.69 ± 4.27	0.050
Metamielocitos eosinófilos	0.00 ± 0.00	0.24 ± 0.41	0.19
Granulocitos heterófilos	7.45 ± 4.66	4.85 ± 2.17	0.30
Granulocitos eosinófilos	0.11 ± 0.19	0.04 ± 0.11	0.42
Granulocitos basófilos	0.07 ± 0.13	0.22 ± 0.32	0.42
Total	8.52 ± 5.28	11.04 ± 5.02	0.11
Total mieloides	20.76 ± 7.58	44.24 ± 8.52	0.006
Osteoclastos	0.75 ± 0.46	1.23 ± 0.52	0.20
Mitosis	2.49 ± 1.26	3.57 ± 2.73	0.37

M = Promedio.
σ = Desviación standard.

(Continúa)

CUADRO 3 *(Continuación)*

MIELOGRAMAS

Días de incubación	15		
	Normales	Infectados	
Horas de inoculados	—	96	
Número de embriones	5	5	
	M ± σ %	M ± σ %	P.
Serie roja primitiva			
Megaloblastos	0.26 ± 0.17	0.24 ± 0.34	0.91
Megalocitos policromáticos	0.39 ± 0.40	0.76 ± 1.07	0.41
Megalocitos ortocromáticos	2.45 ± 1.33	1.88 ± 0.73	0.41
Total	3.10 ± 2.00	2.88 ± 1.96	0.81
Serie roja definitiva			
Proeritroblastos	0.95 ± 0.54	0.97 ± 0.84	0.98
Eritroblastos basófilos	6.00 ± 4.04	4.65 ± 2.96	0.66
Eritroblastos policromáticos	19.83 ± 6.45	11.49 ± 3.01	0.048
Eritrocitos policromáticos	9.55 ± 2.71	5.80 ± 1.85	0.04
Eritrocitos ortocromáticos	21.20 ± 4.68	12.78 ± 4.91	0.014
Total	57.53 ± 5.53	35.71 ± 10.28	0.010
Células poco diferenciadas			
Histiocitos	12.44 ± 6.58	4.10 ± 1.59	0.022
Hemocitoblastos	6.79 ± 1.39	6.97 ± 3.22	0.97
Total	19.23 ± 6.98	11.07 ± 4.65	0.060
Serie mieloide			
Mieloblastos	3.35 ± 0.97	8.77 ± 4.13	0.024
Promielocitos	4.22 ± 2.02	12.48 ± 2.98	0.008
Mielocitos heterófilos	5.30 ± 3.75	11.91 ± 6.54	0.038
Mielocitos eosinófilos	0.32 ± 0.29	0.27 ± 0.28	0.98
Mielocitos basófilos	0.21 ± 0.20	0.54 ± 0.34	0.040
Total	13.40 ± 5.25	33.96 ± 11.62	0.06
Metamielocitos heterófilos	1.18 ± 0.98	6.46 ± 3.10	0.020
Metamielocitos eosinófilos	0.00 ± 0.00	0.21 ± 0.30	0.23
Granulocitos heterófilos	4.36 ± 7.08	8.21 ± 7.13	0.050
Granulocitos eosinófilos	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.26	0.33
Granulocitos basófilos	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.14	0.37
Total	5.55 ± 7.22	15.06 ± 8.89	0.022
Total mieloides	18.95 ± 5.82	49.02 ± 10.60	< 0.001
Osteoclastos	1.19 ± 0.58	1.32 ± 0.42	0.49
Mitosis	2.73 ± 0.90	2.06 ± 0.87	0.29

M = Promedio.
σ = Desviación standard.

(Continúa)

CUADRO 3 *(Continuación)*

MIELOGRAMAS

Días de incubación	16		
	Normales	Infectados	
Horas de inoculados	—	120	
Número de embriones	4	4	
	M ± σ	M ± σ	p.
Serie roja primitiva			
Megaloblastos	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.20	0.39
Megalocitos policromáticos	0.28 ± 0.34	0.25 ± 0.30	0.23
Megalocitos ortocromáticos	0.90 ± 1.12	0.89 ± 0.29	0.98
Total	1.18 ± 1.40	1.24 ± 0.76	0.92
Serie roja definitiva			
Proeritroblastos	1.17 ± 0.92	0.50 ± 0.60	1.16
Eritroblastos basófilos	8.57 ± 4.71	2.60 ± 2.16	0.12
Eritroblastos policromáticos	26.24 ± 12.85	6.43 ± 5.61	0.094
Eritrocitos policromáticos	9.77 ± 4.80	4.85 ± 1.85	0.23
Eritrocitos ortocromáticos	14.29 ± 8.33	9.50 ± 4.80	0.45
Total	60.05 ± 7.69	23.87 ± 13.17	0.032
Células poco diferenciadas			
Histiocitos	6.97 ± 5.79	5.93 ± 3.67	0.94
Hemocitoblastos	5.63 ± 1.53	5.46 ± 0.86	0.87
Total	12.60 ± 8.60	11.38 ± 4.38	0.94
Serie mieloide			
Mieloblastos	4.46 ± 1.67	6.11 ± 1.00	0.036
Promielocitos	5.24 ± 1.42	8.33 ± 4.76	0.39
Mielocitos heterófilos	10.19 ± 3.21	16.45 ± 8.40	0.25
Mielocitos eosinófilos	0.20 ± 0.25	0.25 ± 0.17	0.97
Mielocitos basófilos	0.77 ± 0.64	0.25 ± 0.17	0.12
Total	20.86 ± 5.10	31.39 ± 8.40	0.11
Metamielocitos heterófilos	1.83 ± 1.80	12.63 ± 4.31	0.084
Metamielocitos eosinófilos	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.15	0.36
Granulocitos heterófilos	2.15 ± 1.21	18.01 ± 6.24	0.016
Granulocitos eosinófilos	0.06 ± 0.13	0.39 ± 0.28	0.072
Granulocitos basófilos	0.13 ± 0.12	0.10 ± 0.20	0.86
Total	4.18 ± 2.12	31.22 ± 11.09	0.026
Total mieloides	25.04 ± 3.18	62.61 ± 16.45	0.014
Osteoglastos	1.13 ± 0.60	0.89 ± 0.35	0.44
Mitosis	2.61 ± 1.03	1.77 ± 0.75	0.38

M = Promedio.
σ = Desviación standard.

El total de la serie, siempre fué mayor entre los normales y significativamente desde las 72 horas de la infección momento a partir del cual la caída de esta serie en los infectados, es más pronunciada.

También en las células eritrocíticas del grupo infectado se observó la presencia de "vacuolas".

Células poco diferenciadas. (Gráfico 6)

Las histiocitarias, prevalecen en el grupo de normales en todo el lapso y significativamente a los 13 y 15 días de incubación, en tanto

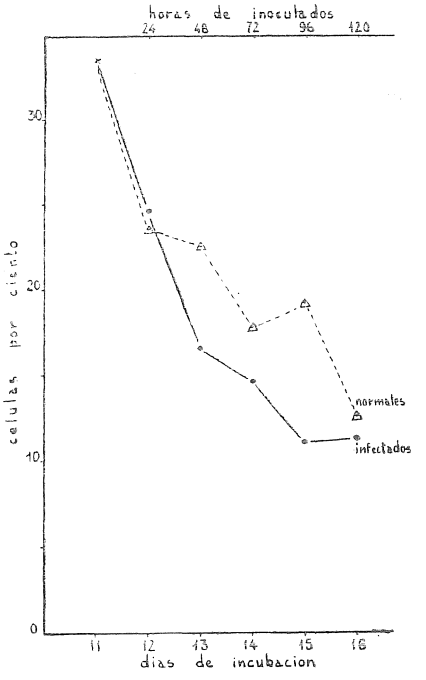

GRÁFICO 6.

los hemocitoblastos no mostraron diferencias dignas de mención. La suma de estas células, sigue el curso de las que priman (histiocitarias) y alcanza valores muy similares.

Serie mieloide.

Los mieloblastos preponderan en los infectados y con valor estadístico desde las 48 horas de la infección. El comportamiento de los promielocitos es similar al de los mieloblastos, a partir de las 48 horas, pero el valor estadístico se reduce a las 72 y 96 horas de la infección.

Los mielocitos heterófilos siempre dominan en número en el grupo de infectados y significativamente a las 48, 72 y 96 horas de la

inoculación. Los mielocitos eosinófilos y basófilos, unas veces predominan en un grupo u otro, siéndolo significativamente los eosinófilos de los infectados a las 72 horas, los basófilos de los normales a las 48 horas y en los infectados a las 96 horas.

El grupo de células inmaduras (en conjunto mieloblastos, promielocitos y mielocitos) descuella siempre entre los infectados, con significativo estadístico a las 48 y 72 horas. Gráfico 7.

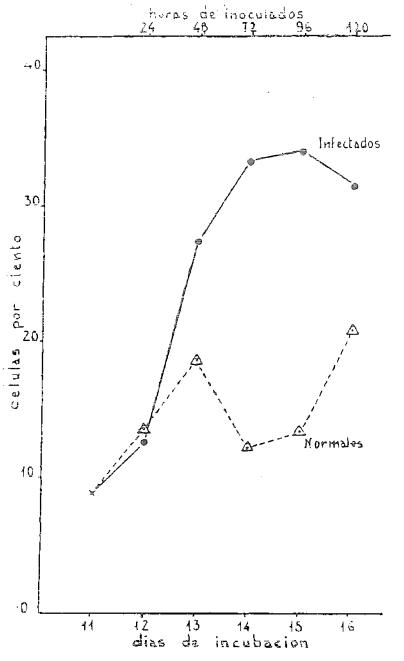

GRÁFICO 7.

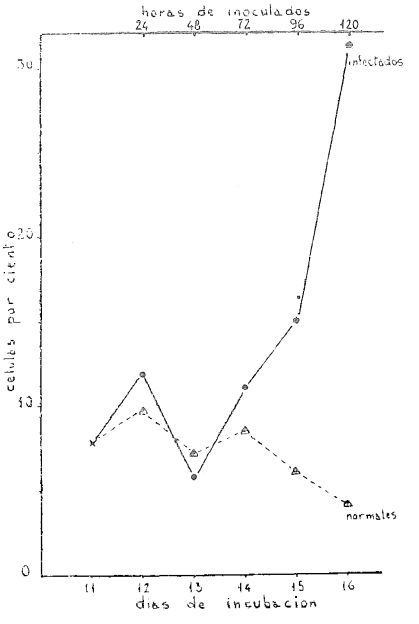

GRÁFICO 8.

De los metamielocitos, los heterófilos numéricamente superiores en los infectados muy precozmente (desde las 24 horas de inoculados) tienen significación a las 48 y 72 horas; y los eosinófilos se observaron únicamente entre los infectados a partir de las 24 horas, pero, no presentándose en todas las muestras (gran variación), lo cual les resta valor estadístico.

En lo referente a los granulocitos, hubo predominio de uno u otro lote (normales e infectados). Los granulocitos heterófilos fueron más en los normales a las 48 y 72 horas, y en los infectados a las 24, 96 y 120 horas, en estas dos últimas con valor estadístico. En cuanto a los eosinófilos y basófilos, predominaron en los normales a las 24, 48 y 72 horas, para prevalecer después en los infectados, pero sin alcanzar los valores básicos de significación.

El total de las células granulocíticas maduras, excepto a las 48 horas de inoculados, fué mayor en la médula ósea de los infectados y la diferencia con los controles fué significativa a las 96 y 120 horas. Gráfico 8.

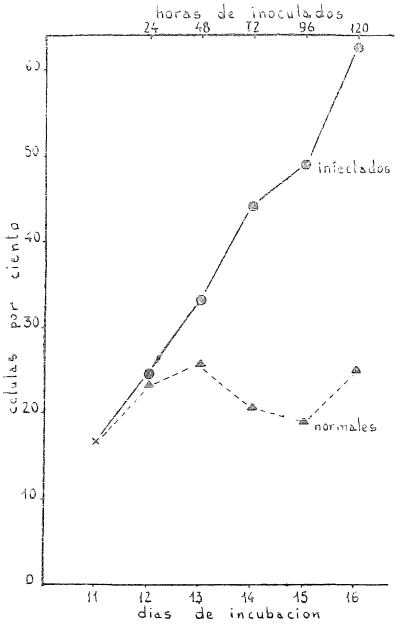

GRÁFICO 9.

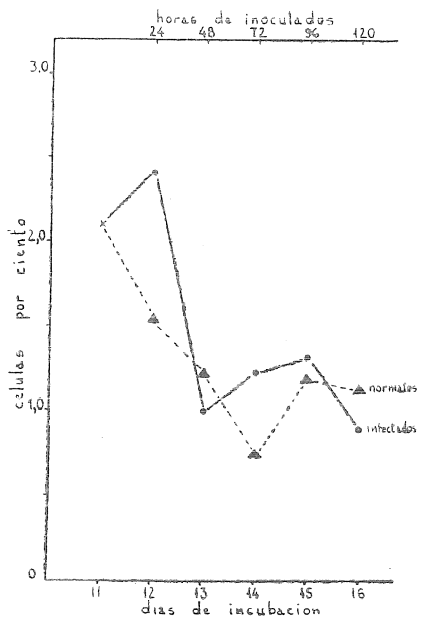

GRÁFICO 10.

En todos los casos fué más elevado el porciento de células mieloides totales (maduras e inmaduras), entre los embriones infectados y significativo desde las 72 horas de inoculados. Gráfico 9.

Osteoclastos.

Se observó una diferencia significativa a favor de los embriones infectados a las 24 horas del inóculo y después, fueron variadas las relaciones entre ambos lotes. Gráfico 10.

Mitosis. (Gráfico 11)

También la actividad cariocinética de las células hemocitopoiéticas se ve implicada en el complejo mecanismo desenvuelto por el virus en su acción patógena, mostrando reacción más intensa (aumento de número) al comienzo de la infección, persistiendo hasta las 72 horas de ésta, para después, descender por debajo de los valores observados

en la médula ósea de los embriones normales. En ningún caso, en razón de la gran variación individual, los datos registrados tuvieron significación.

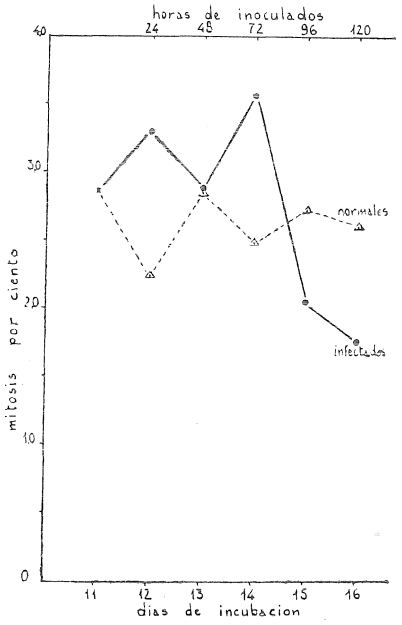

GRÁFICO 11.

RELACIONES EXISTENTES ENTRE LA SANGRE PERIFÉRICA Y LA MÉDULA ÓSEA

Es notable en los embriones infectados, la oligocitemia y la oligocromemia, reflejadas también en los porcientos del citograma y del mielograma, por la distinta representación y significado de los diversos elementos celulares hemoglobínicos. En primer término la persistencia de un mayor número de células rojas primitivas en la circulación solamente; en segundo lugar un aumento en la sangre periférica, de células eritroblásticas inmaduras (proeritroblastos, eritroblastos basófilos y policromatófilos), con reducción porcentual de las mismas en la médula ósea; y tercero, aumento de eritrocitos policromáticos y descenso de eritrocitos maduros (ortocromáticos), desde las 96 horas en la periferia, en tanto, en la médula ósea su número para ambas células siempre fué inferior al de los embriones normales.

Todas estas desviaciones celulares se manifiestan en el total de las células eritroblásticas principalmente, tanto en la sangre como en médula ósea, y de esta manera explican las diferencias halladas en la cantidad de glóbulos rojos y de hemoglobina.

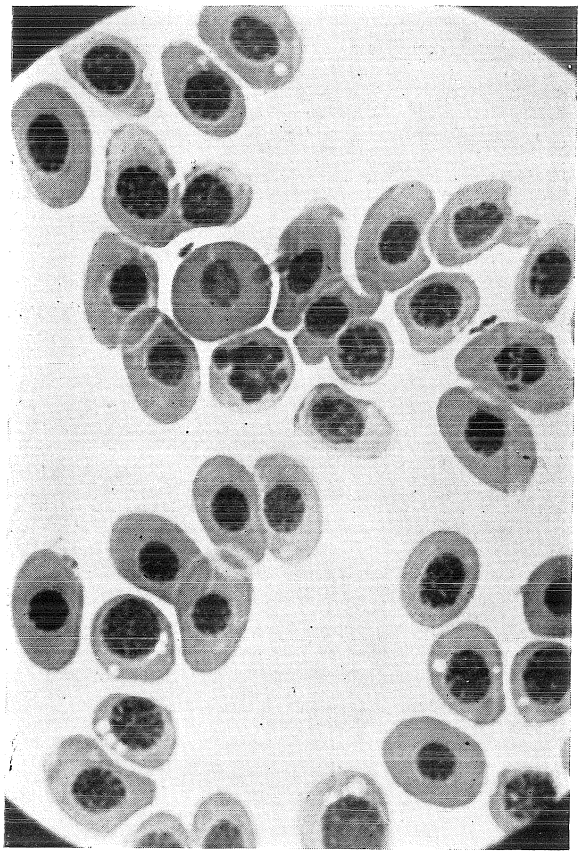

FIG. 1. — Sangre de embrión de pollo de 13 días de incubación, infectado 48 antes con virus "A" de Influenza. Muchos de los eritroblastos y eritrocitos presentan de 1 a 3 "vacuolas". Se destacan también la inmadurez de las células rojas y una evidente anisocitosis y poiquilocitosis; se observan un megalocito y un eritroblasto en mitosis.

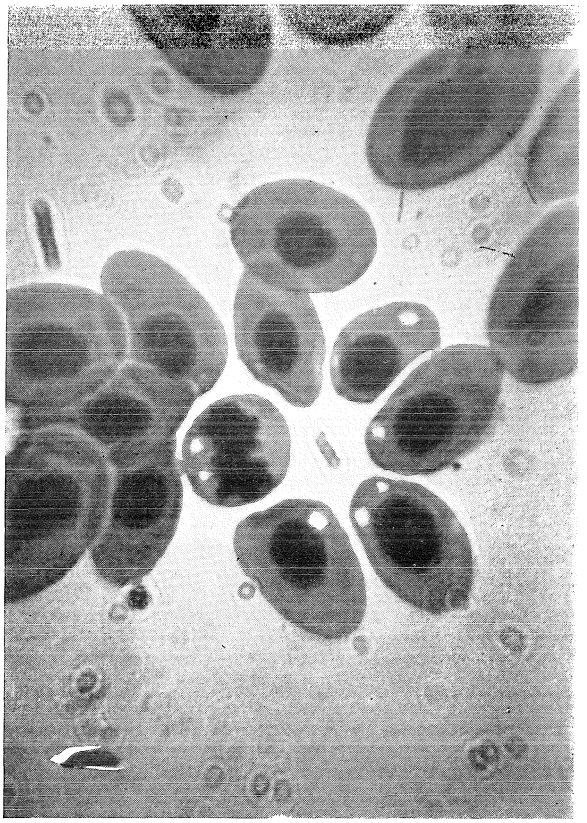

FIG. 2. — Sangre de embrión de pollo de 13 días de incubación, infectado 48 horas antes con virus "A" de Influenza. Se muestran eritroblastos policromatófilos uno en mitosis y eritrocitos policromáticos con "vacuolas".

La cantidad de células leucocitarias (mieloides), en el citograma periférico y en el central fué siempre, en los embriones infectados, muy superior a la de los embriones normales. De tal manera, aparecería el virus como estimulando la reacción de las células mieloides leucocitarias y como inhibiendo la eritropoiesis, causando en las células eritroblásticas modificaciones citoplasmáticas ("vacuolas").

Las mistosis, tanto en la sangre periférica donde la diferencia a favor de los embriones infectados es muy significativa desde las 48 horas en adelante, como en la médula ósea donde éstas son también, más elevadas hasta las 72 horas, indican el intenso estímulo del virus en la actividad celular al comienzo de la infección, para luego, caer a valores normales en la sangre y por debajo de ellos en la médula ósea (inhibición).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se ha inoculado el virus A de influenza en huevos fértiles de once días de incubación, estudiándose paralelamente con huevos fértiles normales, la cantidad de hematies y de hemoglobina, el hemograma y el mielograma. Se hicieron las comprobaciones siguientes:

1º Reducción del contenido de hematies y de hemoglobina en la sangre de los embriones infectados, con

2º Modificaciones cualicuantitativas en las series roja primitiva y definitiva, en el hemograma y mielograma.

3º Modificaciones citoplasmáticas en las células eritroblásticas, periféricas y centrales, consistiendo en la presencia de "vacuolas" únicas o múltiples.

4º Gran reacción mieloide central (médula ósea) y aumento consecutivo en la sangre periférica.

5º Notable aumento de las mitosis (sangre y médula ósea).

6º Se discuten los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

(1) PARODI, A. S., PENNIMPEDE, F. C., LAJMANOVICH, S., y MITTELMAN, N.: Disminución ponderal del embrión de pollo por la infección con virus A de influenza. *Ciencia e Investigación*, 1947, 3, 392.

(2) PENNIMPEDE, F. C., PARODI, A. S., LAJMANOVICH, S., y MITTELMAN, N.: Modificaciones producidas en el huevo fértil de pollo por la inoculación del virus A de influenza. I. Distribución del virus. *Rev. Inst. Bact. "Malbrán"* (en prensa).

(3) MITTELMAN, N., LAJMANOVICH, S., PARODI, A. S., y PENNIMPEDE, F. C.: Idem. II. Consumo de oxígeno y producción de anhídrido carbónico, *Rev. Inst. Bact. "Malbrán"* (en prensa).

(4) LAJMANOVICH, S., MITTELMAN, N., PARODI, A. S., y PENNIMPEDE, F. C.: Idem. III. Volumen y pH del líquido alantoideo. *Rev. Inst. Bact. "Malbrán"* (en prensa).

(5) PARODI, A. S., PENNIMPEDE, F. C., LAJMANOVICH, S., y MITTELMAN, N.: Idem. IV. Peso de los embriones y membranas corioalantoideas. Conclusiones. *Rev. Inst. Bact. "Malbrán"* (en prensa).

(6) PARODI, A. S., LAJMANOVICH, S., PENNIMPEDE, F. C., y MITTELMAN, N.: Changes in embryonated eggs inoculated with influenza virus. *J. Immunol.*, 1948, 58, 109.

(7) PENNIMPEDE, F. C.: Acción del virus A de influenza sobre el peso de los distintos constituyentes del huevo de gallina en desarrollo. Tesis de la Universidad de La Plata, 1947.

(8) PAPPALARDO, M. H.: Comunicación personal.

(9) PENNIMPEDE, F. C.: Hemograma y mielograma de los embriones de pollo. *Rev. Inst. Bact. "Malbrán"* (en prensa).

(10) SORDELLI, A., TAYLOR, R. M., y PARODI, A. S.: Estudio de los virus de la epidemia de influenza ocurrida en la Argentina en el año 1940. *Rev. Inst. Bact.*, 1941, 10, 265.

(11) HIRST, G. K.: The quantitative determination of influenza virus and actibodies by means of the red cells. agglutination. *J. Exp. Med.*, 1942, 75, 49.

(12) UDNY YULE, G., y KENDALL, M. G.: An introduction to the theory of statistics. Londres, 1940.