Acción del virus "A" de influenza sobre el peso de los distintos constituyentes del huevo de gallina en desarrollo

por Francisco Cayetano Pennimpede

Resumen de la Tesis presentada para optar al título de Doctor en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional de La Plata.

La bibliografía, si bien es abundante y variada, en lo que se refiere a los distintos períodos de la evolución del huevo de gallina normal y a los cambios que cada una de sus partes sufre durante el período de incubación, es extremadamente pobre, podría decirse virgen aun de investigaciones, en lo que concierne a huevos incubados e inoculados con virus, o sustancias inocuas, tales como solución fisiológica.

Desde el momento en que el huevo de gallina entró a formar parte del material vivo de experimentación en la bacteriología, y especialmente en la virología, se han realizado múltiples estudios, referentes: I) *a técnicas y vías de inoculación* (sobre la membrana corioalantoidea, en la cavidad alantoidea, en el saco amniótico, en el saco vitelino, en el embrión, endovenosa, etc.); II) *a días de incubación previos a la inoculación* (5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 y 13) dependiendo éstos de un modo general de la vía a utilizarse para inocular; III) *a temperaturas óptimas de incubación luego de inoculados* (35° 37° y 39°C., son las acostumbradas y de acuerdo a cada virus en particular); IV) *a períodos de incubación luego de inoculados;* para la cosecha y extracción de distintos materiales (que serán empleados: como fuente de virus, destinados al pasaje, preparación de vacunas, estudios de anatomía patológica, distribución de virus, tiempo de muerte del embrión, verificación de lesiones, etc.); V) *a estudios de titulación y neutralización de virus,* etc.

Pero muy poco se ha realizado a propósito de las modificaciones que un virus o una bacteria pueden causar sobre una de las partes del huevo en desarrollo.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 2 de diciembre de 1947.

El primer trabajo fué realizado por The Research Staff of U. S. Navy Medical Research Unit Nº 1, encontrando que el peso de los embriones de los huevos infectados con virus A de influenza era consistentemente menor al peso de los huevos no infectados; hecho también verificado por nosotros. Recientemente Henle y Henle encuentran que el virus A de influenza irradiado con luz ultravioleta, interfiere con el poder inhibitorio del desarrollo de los embriones del virus activo.

Desde 1944 se ha estado trabajando, en la Sección Virus del Instituto Bacteriológico "Malbrán", sobre las variaciones que causaba la inoculación del virus A de influenza en el huevo de gallina en desarrollo, y se han realizado a este propósito, las comprobaciones siguientes:

1º — Que los embriones inoculados con virus de influenza, pesaron significativamente menos que los normales desde las 48 horas en adelante. La diferencia se acentúa en el transcurso del tiempo. El porcentaje de aumentos de los embriones en función del tiempo, reproduce modificada la curva de Minot. En los infectados el aumento es de ritmo menor que en los normales, pero que ambas líneas tienden a unirse a las 144 horas (Parodi, Pennimpede, Lajmanovich y Mittelman. Cienc. e Invest.).

2º — Que mientras el peso del embrión era menor a partir de las 48 horas, la membrana corioalantoidea pesaba más en el huevo infectado que en el normal desde las 48 a 96 horas y que se igualaban a las 120 horas, para invertirse los valores a las 144 horas (Parodi, Pennimpede, Lajmanovich y Mittlman).

3º — Que la cantidad de líquido alantoideo era significativamente más voluminosa en los huevos infectados a partir de las 24 horas, llegando a un máximo entre las 72 y 96 horas, y que el pH de este líquido alantoideo era mayor que el del normal, con un máximo a las 72 horas (Lajmanovich, Mittelman, Parodi y Pennimpede).

4º — Que en los huevos inoculados con virus se observa una disminución general del intercambio gaseoso, proporcional a la disminución del peso de los embriones, sin una modificación sustancial del tipo de sustancias quemadas (igualdad de coeficientes respiratorios) y que el ritmo de ese retardo se mantiene aún después que la mayor parte del virus ha desaparecido (Mittelman, Lajmanovich, Parodi y Pennimpede).

5º — Que el virus: a) en las membranas corioalantoideas alcanza su máximo título a las 24 horas; b) en el líquido alantoideo a las 48, y c) en los embriones no parece sufrir variaciones importantes durante el curso de la experiencia (Pennimpede, Parodi, Lajmanovich y Mittelman).

Estos resultados dejaron, indudablemente sentada, una base para el ulterior estudio de este tópico; pues en estos trabajos sólo se estudiaron modificaciones en tres de los elementos constituyentes del

huevo de gallina en desarrollo: peso del embrión, peso de la membrana corioalantoidea y el volumen y pH del líquido alantoideo. Quedando por estudiarse las partes restantes, membrana y líquido amnióticos, saco vitelino, yema, clara y cáscara, y, la relación del huevo total con respecto a estos constituyentes.

Esta tesis tiene por objeto abocarse al estudio de las variaciones de cada una de las partes constituyentes, comprobando los hechos antes mencionados y verificando otros hechos. En cuanto a los hechos anteriormente comprobados, como lo muestran las experiencias, son ampliamente corroborados; y respecto a los nuevos hallazgos, podemos anticipar que ponen de relieve más claramente los trastornos ocasionados, en el huevo en desarrollo, por el virus A de influenza.

Es de rutina en los laboratorios destinados al estudio de los virus y de un modo especial, en los dedicados al estudio de la influenza, el empleo del huevo fértil de gallina, incubado durante 11 días a 37,8°C. (100°F.), y su inoculación con materiales conteniendo o sospechados de contener virus de influenza, sea del tipo A o B, actualmente conocidos, con el propósito de:

a) el mantenimiento de cepas;
b) el aislamiento o adaptación de otras nuevas;
c) la titulación de virus;
d) realizar pruebas de neutralización con sueros de convalecientes de la enfermedad, o experimentales;
e) obtener antígenos: embrión, membrana corioalantoidea, líquidos amniótico y alantoideo, ya sea para destinarlos a fijación de complemento o en el caso del líquido alantoideo como fuente de virus para la confección de vacunas;
f) realizar estudios experimentales, etc.

El huevo de gallina es un elemento fácil de adquirir en cualquier época del año, en grandes cantidades y de costo relativamente bajo. Con otras ventajas, tales como las de su manuabilidad, tamaño reducido, muy poco exigente en lo referente a cuidados, siéndole suficiente, temperatura y humedad adecuadas.

Un hecho notable de este material, y que no puede lograrse con ningún otro, es la posibilidad de usar para inocular, en el huevo en desarrollo, zonas de origen embrionario perfectamente definidas y que la distribución de éstas es poco menos que esquemática, lo que nos da idea de la facilidad con que se puede lograr el acceso a ellas, y la repetición cada vez que es necesaria. Por otra parte es un rico y rápido productor de virus. En el caso del virus de influenza, ya a las 24 horas, éste aparece en grandes cantidades, aunque es de práctica la extracción del líquido alantoideo (que es el material más abundante, de más fácil extracción y rico en virus), a las 48 horas, momento en el cual el virus ha alcanzado su máximo de multiplicación.

Como material de uso tan corriente es que el huevo ha sido objeto de múltiples estudios, a los cuales nos hemos referido más arriba.

Al comienzo de estos trabajos se creyó que las modificaciones tenían lugar únicamente en el embrión, pero a medida que adelantábamos en la investigación, observamos que el virus en su invasión, hacía sentir su presencia de una u otra manera sobre otros elementos: membrana corioalantoidea y líquido alantoideo, hechos que hemos mencionado más arriba. Ahora presentamos una serie de experiencias en las cuales se revela que todo y cada una de las partes del huevo en desarrollo, son influenciados por el virus de influenza, en grado mayor o menor en uno u otro sentido.

Debemos recalcar, que las modificaciones o variaciones observadas son notables y evidentes, en los huevos de gallina en desarrollo, cuando existe la infección con el virus A de influenza, que fué el empleado por nosotros.

MATERIAL Y TÉCNICAS

A. MATERIALES

Para la realización de este trabajo, se dispuso de todo el equipo y materiales, de que dispone la Sección Virus del Instituto Bacteriológico "Malbrán".

1º — Una balanza de platillo con tres brazos (Cenco) al centígramo.

2º — Huevos de gallina Leghorn blanca.

3º — Ratones blancos, de la cepa Rockefeller Institute.

4º — Cepa 7 de virus A de influenza, aislada en el país en 1940. Lleva numerosos pasajes por ratón y por huevo. Este virus se conserva a -76°C.

5º — Glóbulos de pollo recogidos sobre citrato de sodio y lavados tres veces con solución fisiológica.

6º — Líquido alantoideo normal.

7º — Solución fisiológica.

B. TÉCNICAS

1º — *Incubación de los huevos*:

Para este trabajo se han utilizado únicamente huevos de gallina Leghorn blanca, en razón de su color blanco uniforme y por tanto muy fáciles de revisar al ovoscopio. Luego de un descanso de no menos de 24 horas, después de llevados al laboratorio, se disponían en las bandejas, que eran llevadas a la cámara incubadora a 37,8°C. (100° F.), con una humedad del 60-61 %, y ventilación adecuada. Cada 24 horas eran cambiados de posición, mediante un movimiento de bandeja; permaneciendo en esta cámara durante 10 días.

2º — *Revisión de los huevos y clasificación*:

Al décimo día eran examinados al ovoscopio, desechándose los estériles (no fértiles) y los muertos.

Los huevos con embrión vivo, se marcaban con lápiz común sobre la cámara de aire y sobre la parte de la cáscara, que correspondiese a una zona de membrana corioalantoidea, libre de vasos.

Seguidamente los huevos eran pesados y distribuídos en tres grupos según el peso:

Grupo 1 de peso inferior a 55 grs.
Grupo 2 de peso entre 55 y 60 grs.
Grupo 3 de peso superior a 60 grs.

Este método nos permitió la formación de grupos homógenos. Luego los huevos volvían a la incubadora, hasta el día siguiente.

3º — *Inoculación de los huevos*

Al undécimo día, los huevos eran retirados de la incubadora. Se distribuían en dos lotes, cada una con un número equivalente de huevos de cada grupo de pesos. Cada huevo, individualmente, era limpiado con un algodón impregnado en Antibacter, a continuación, con el torno, se hacían perforaciones de la cáscara en las zonas marcadas el día anterior. Con un gotero se vertían unas gotas de alcohol sobre las perforaciones; luego, con una lanceta de vacunador quemada, se rompía la membrana coclear de la cámara de aire. Esta operación, tiene por objeto descomprimir.

Mediante una jeringa de 2 mls. graduada al décimo, un lote fué inoculado en la cavidad alantoidea, a través de la perforación practicada sobre la cáscara en la zona de la membrana corioalantoidea, con 0,1 ml. de una dilución 10^{-3}, es decir 1 en 1.000 de un líquido alantoideo conteniendo virus de influenza. El otro lote (control) fué inoculado con la misma técnica, pero con una dilución equivalente de líquido alantoideo normal. En algunos casos se utilizó directamente solución fisiológica. La abertura producida por la inoculación, era obturada con una gota de parafina fundida. Los huevos eran vueltos a llevar a una incubadora, pero ésta graduada a una temperatura de 37°C. (98,6°F.), y ya no se los volvía a cambiar de posición, como en la primera parte de la incubación.

4º — *Observación y empleo de los huevos inoculados*

A partir del momento de inoculados, cada 24 horas se extraían de la inoculadora, 8 a 10 huevos, con embrión vivo, de cada lote. Estos eran pesados, se marcaba el contorno de la cámara de aire con lápiz, se aseptizaba con Antibacter. Con el torno se procedía a cortar la cáscara, se goteaba alcohol sobre el corte y mediante unas tijeras curvas y unas pinzas se separaban los casquetes, que eran numerados como el huevo correspondiente, y se colocaban en una cápsula. A continuación se realizaban las siguientes operaciones: I°) con una jeringa de 20 mls.: extracción a través de la membrana coclear, al descubierto, de todo el líquido alantoideo anotando la cantidad, por huevo o grupo de huevos, según la experiencia, aunque, siempre se verificó individualmente el contralor de esterilidad, sembrando 0,1 ml. en un tubo de agar sangre y la presencia de virus; también se comprobó colorimétricamente al pH en el instante de la extracción luego de verificado el volumen extraído, con una gota de líquido alantoideo que se vertía en una piedra de toque conteniendo una solución diluída de Azul de Bromo Timol, obteniéndose una idea grosera de la reacción del líquido; pues según experiencia de este laboratorio, en general, todos los líquidos ácidos, es decir los que hacen virar al indicador al amarillo, no contienen virus vivo.

IIº) Inclinando el huevo, se hacía salir, por la abertura de la cáscara, el amnios con el embrión y con una jeringa de 5 mls., era punzado el saco, extrayéndose el líquido amniótico; en algunos casos se hacía caer directamente el líquido en una cápsula de Petri, pero, de una u otra manera, la extracción siempre fué total y el volumen registrado.

IIIº) Con una pinza curva se extraía el embrión, cortando el cordón, al ras de su implantación, colocándose sobre una hoja de papel de filtro tarada, doblada en cuatro y colocada sobre una cápsula de Petri.

IVº) Volcando el huevo, en forma que se permitiése la salida del saco vitelino con la yema, por la abertura, cuidando de no hacer caer la clara. Con una pinza nos ayudamos en la extracción. En algunas experiencias, hemos separado el saco vitelino de la yema, pero hay momentos del desarrollo, que esta operación no ofrece garantías de precisión. La yema y saco vitelino se depositaban en cápsulas.

Vº) A continuación, con una pinza curva, que apoyada contra la pared del huevo y realizando movimientos circulares, desprendíamos las membranas conjuntamente con la clara, que recibíamos en una cápsula de Petri; con dos pinzas curvas separábamos la clara de las membranas (corioalantoidea y amnios, que con esta técnica salen juntas).

VIº) Con las pinzas apartábamos las membranas corioalantoidea y amniótica, colocándolas sobre sendos papeles de filtro tarados. Las membranas eran agotadas de su líquido por frotamiento contra el papel de filtro.

VIIº) Se juntaban cada cáscara con su respectivo casquete. En ningún caso hemos intentado separar la membrana coclear de la cscara, de tal modo que las cifras logradas corresponden a ambas en conjunto.

VIIIº) Se procedía a pesar cada una de los elementos separados, como así también los papeles de filtro, obteniéndose por diferencia el peso del líquido absorbido por ellos.

En algunas experiencias, tales como las que se investigaba pérdida de peso, cada 24 horas únicamente se pesaba el huevo entero, volviéndolo otra vez a la incubadora. Verificándose la presencia de virus al final e incluyendo en los cálculos sólo los sobrevivientes al final de la experiencia.

5º — *Verificación de la presencia de virus.*

Se utilizaron dos métodos: "in vitro" e "in vivo".

El primero, prueba de Hirst, consiste en poner de manifiesto la propiedad que tienen los líquidos extraembrionarios que contienen virus, de aglutinar los glóbulos rojos de pollo. Se procedió de la siguiente manera: a 1 ml. de líquido extraído, se agregaba 1 ml. de una suspensión de glóbulos de pollo al 2 % en solución fisiológica y luego se preparaba una escala de testigos de 4 tubos conteniendo: 1; 1.25; 1,50 y 1,70 mls. de solución fisiológica cada uno, completando a 2 mls. con suspensión de glóbulos de pollo al 2 %. Luego cada tubo era agitado, dejándose a temperatura del laboratorio durante una hora. Al cabo de este tiempo se comparaba frente a una pantalla de vidrio esmerilado, el tubo de prueba con la escala de testigos, tomándose en cuenta para la lectura la opacidad del sobrenadante. El primer testigo equivale a O aglutinación, de tal manera que todo tubo que muestra un sobrenadante de opacidad menor, igual o mayor que los tubos 2, 3 y 4, tendrá 1+, 2+, 3+ ó 4+.

Se consideró negativo todo tubo que daba O, es decir cuyo sobrenadante era de opacidad igual al primer tubo testigo, en cuyo caso para tener al certeza de la ausencia de virus, se acudía a la prueba "in vivo".

El método "in vivo" consiste en inocular bajo ligera anestesia etérea por vía intranasal 0,05 ml. de líquido en 4 ratones blancos. Se mantienen en observación durante 10 días, registrándose las bajas diariamente, comprobándose las lesiones pulmonares. Al cabo de los 10 días, todos los sobrevivientes se sacrifican, para verificar la presencia o no de lesiones pulmonares típicas.

En muchas ocasiones, comprobamos que líquidos alantoideos sin capacidad aglutinante, mataban o producían las lesiones típicas de influenza en los ratones.

6º — *Método estadístico utilizado*

El método utilizado para el estudio estadístico fué el de "Student", en el cual se consideran las diferencias existentes en los promedios de los grupos

de cada serie, en nuestro caso normales e infectados; aplicándose para el cálculo las siguientes fórmulas del mismo autor:

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

y luego se buscó el valor de "P" en la tabla de "t" de "Student", transcripta por Udny Yule y Kendall.

S= Desviación "standard" de las diferencias entre normales e infectados de cada serie.

d= Medida (en grs. o en mls.) en que un grupo de huevos inoculados con virus, se desvía de un grupo estudiado paralelamente e inoculado con material inocuo (solución de líquido alantoideo normal o solución fisiológica).

d= Promedio de las desviaciones (d) en el total de los grupos que componen una serie de experimentos.

Σ = Sumación.

$\Sigma(d - \bar{d})$ = Suma de los cuadrodos de las diferencias entre d y $\bar{d}$. Por supuesto, para cada serie d varía en cada grupo estudiado y $\bar{d}$ es constante para toda la serie, puesto que es el promedio de la serie.

P= Probabilidad de que una diferencia de magnitud igual o mayor a la observada, ocurra en un experimento análogo, pero con idéntico tratamiento para ambos lotes de huevos.

Nota: Se considera "significativa" toda diferencia cuyo P $\leqq$ 0,05.

ANÁLISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

En este capítulo trataremos de ampliar y aclarar la interpretación de los resultados, aplicando para ello el método estadístico, mediante el cual es posible conocer el valor de las experiencias realizadas y su error probable, su reproducción, la intervención del azar y otras variables, siempre comprendidas en los experimentos de orden biológico.

En este sentido, asesorados por el Dr. Vilches, hemos adoptado la técnica estadística de "Student", para el estudio de los promedios por grupos (pools), con la cual pudo hacerse el estudio estadístico de todas las experiencias. Con la aplicación de este método, indudablemente se hacen más notorias las diferencias y se acrecienta la sensibilidad de sus resultados, pues estos grupos (pools) son considerados como un solo individuo. Además tiene la ventaja de reducir el número de operaciones y establecer la comparación entre cada grupo (normales e infectados) con que se ha trabajado.

A continuación pasaremos revista analítica de los resultados obtenidos y tratados con el método estadístico referido.

1.° EL PESO DEL HUEVO TOTAL

	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	120 hrs.	144 hrs.
N.° de Grupos	20	20	19	20	13	11
Peso promedio en gramos						
Normales	50,06	51,35	52,09	54,19	54,95	56,09
Infectados	49,65	51,56	53,06	54,56	54,99	56,18
Diferencia	0,41	—0,21	—0,97	— 0,37	—0,04	—0,09
S	1,39	1,18	1,51	1,33	1,01	1,06
t	1,36	0,807	2,82	1,23	0,14	0,28
P	0,18	0,45	0,012	0,23	0,89	0,78

Como se muestra en este cuadro, el análisis estadístico, prueba que ambos grupos de huevos eran comparables, que las oscilaciones observadas pueden ser simplemente debidas al azar. Pero sin duda, es atribuíble a otra razón, que casi siempre, a las 72 horas, los huevos infectados pesasen significativamente más que los normales; y con toda probabilidad no es imputable a un defecto sistemático de agrupación, selección o factores incontrolables inherentes a la experiencia, sino que, verificadas las técnicas, uniformados los métodos de selección de cada grupo, esta diferencia debe inculparse al tratamiento a que ha sido sometido cada uno de ellos. Ahora bien, de un modo general predominó casi siempre el peso de los huevos infectados,

El gráfico 1 representa la marcha en ambos grupos y el gráfico 2 el coeficiente de variación entre ambos.

Gráfico 1.

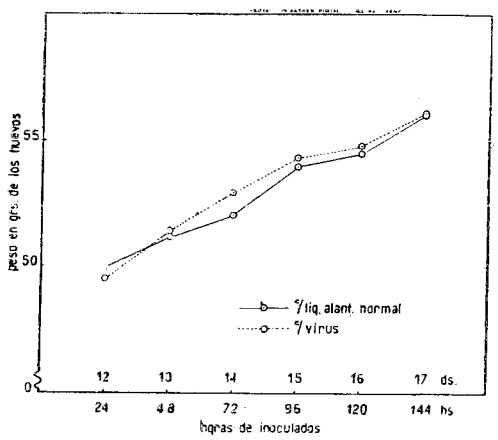
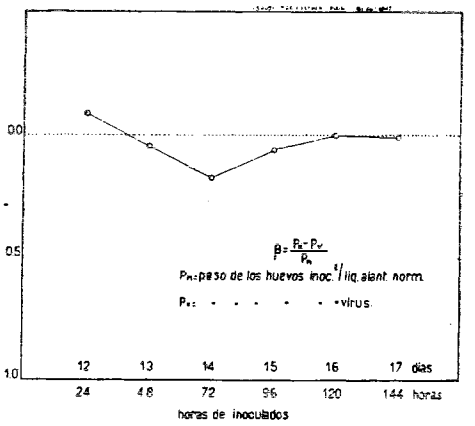


Gráfico 2.



2.° EL PESO DE LOS EMBRIONES

	24 hrs.	48 hrs	72 hrs	96 hrs.	120 hrs.	144 hrs.
N.° de grupos	20	20	19	20	13	11
Peso promedio en gramos						
Normales	4,61	6,13	8,22	11,18	13,81	16,94
Infectados	4,58	5,73	7,38	9,40	11,02	12,61
Diferencia	0,03	0,40	0,84	1,78	2,79	4,33
S	0,333	0,425	0,784	1,29	1,22	2,41
t	0,04	4,21	4,66	6,14	8,20	5,93
P	0,9	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

En este cuadro se muestran los resultados extraordinariamente significativos del análisis estadístico, el cual nos dice que la probabilidad de obtener resultados distintos a los logrados, es a partir de las 48 horas de la inoculación con virus, muy inferior al 1 por mil.

En el gráfico 3 se muestra la divergencia creciente seguida por las curvas de los promedios de cada grupo, y en el gráfico 4, el coeficiente de variabilidad correspondiente, cuyo trazo es prácticamente una línea recta, con una ligera tendencia a partir de las 96-120 horas a descender, disminuyendo la hasta entonces progresiva diferencia. Esto indica que el grupo de embriones infectados, va aumentando su ritmo de desarrollo.

Gráfico 3.

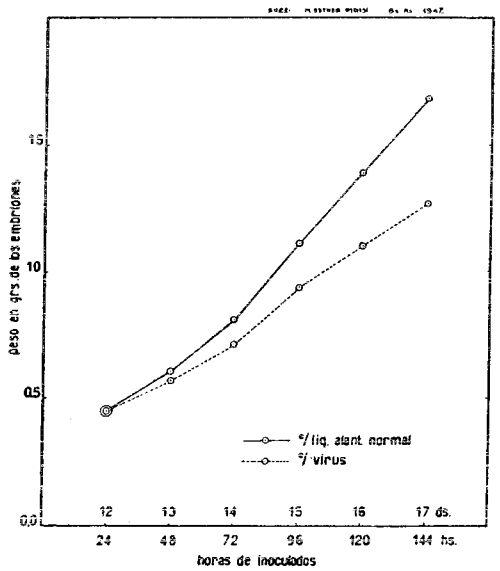
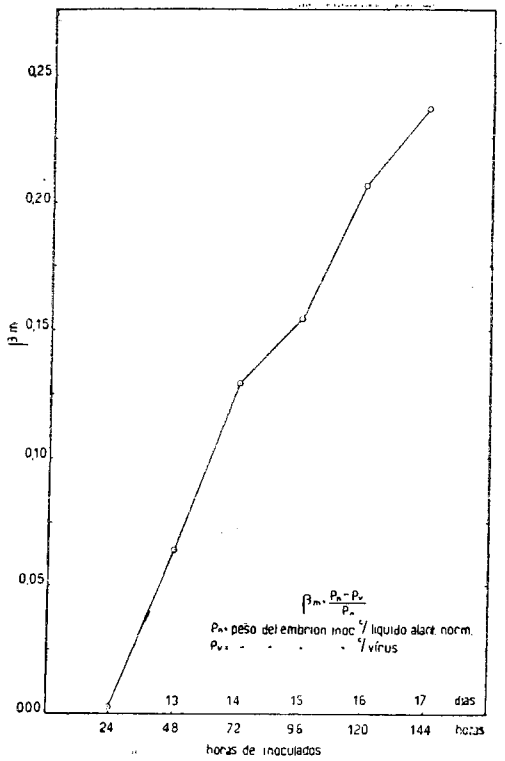


Gráfico 4.



3.° EL PESO DE LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA

	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs	120 hrs.	144 hrs.
N.° de grupos	13	13	13	14	10	11
Peso promedio en gramos						
Normales	0,39	0,37	0,45	0,43	0,39	0,45
Infectados	0,43	0,42	0,54	0,48	0,38	0,36
Diferencia	—0,04	—0,05	—0,09	—0,05	0,01	0,09
S	0,126	0,059	0,153	0,064	0,067	0,113
t	1,33	3,33	2,19	2,94	0,48	2,35
P	0,20	0,006	0,048	0,011	0,71	0,04

Ya a las 24 horas se observa que la membrana corioalantoidea ha reaccionado a la acción del virus, reacción que acrecienta la diferencia significativamente hasta las 96 horas. Para luego a las 120 horas igualarse el peso de las membranas en ambos grupos y a las 144 horas, el fenómeno se ha invertido, estableciéndose una diferencia de peso, estadísticamente significativa, a favor de las membranas corioalantoideas normales.

Los gráficos 5 y 6 muestran las curvas seguidas por ambos grupos y el coeficiente de variabilidad, en el cual se destacan las direcciones seguidas por la significación.

Gráfico 5.

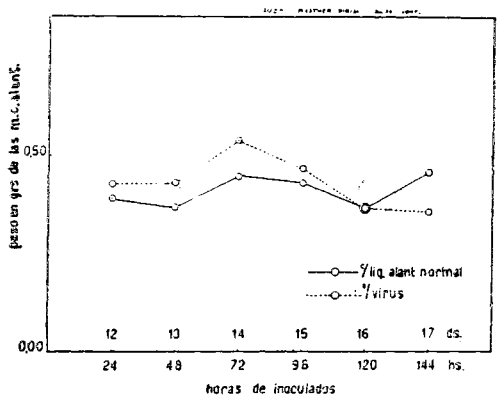
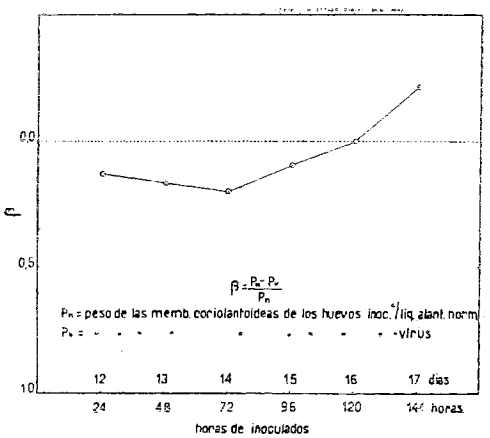


Gráfico 6.



4.° EL PESO DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	120 hrs.	144 hrs.
N.° de grupos	5	5	5	6	3	4
Peso promedio en gramos						
Normales	0,176	0,179	0,229	0,295	0,307	0,346
Infectados	0,165	0,179	0,211	0,244	0,277	0,290
Diferencia	0,011	0,018	0,018	0,051	0,030	0,056
S	0,0408	0,0499	0,0186	0,0294	0,0334	0,0842
t	0,61	0,82	2,17	4,25	1,58	1,33
P	0,58	0,47	0,09	0,008	0,25	0,28

Indiscutiblemente, en este caso el número de experiencias que se comparan, es reducido, pero con toda probabilidad, la significación de las diferencias observadas, tendría más extensión, si el número de éstas hubiese sido mayor. Es notable la regular y progresiva diferencia entre las membranas normales e infectadas, que a las 96 horas tiene significación estadística.

No obstante, como lo muestra el gráfico 7 debe darse valor a la tendencia de las curvas, que en cierto grado repiten la gráfica de los embriones. El gráfico 8 que corresponde al índice de variabilidad certifica la precisión de las experiencias.

Gráfico 7.

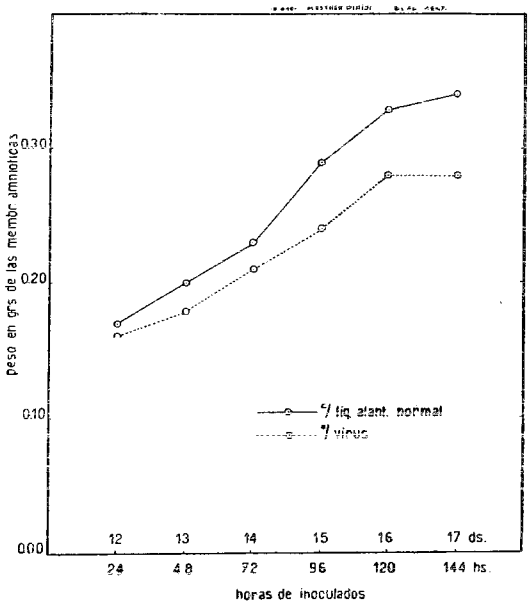
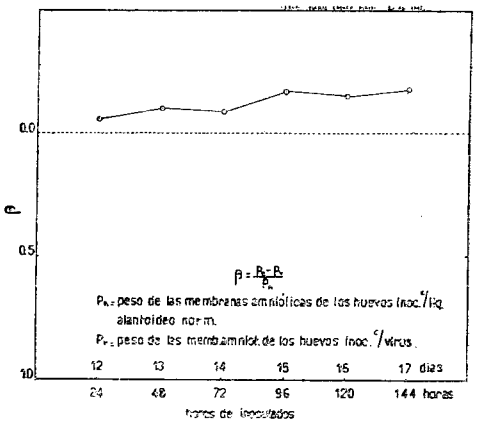


Gráfico 8.



5.° EL VOLUMEN DEL LÍQUIDO ALANTOIDEO

	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	120 hrs.	144 hrs.
N.° de grupos	12	13	14	14	8	10
Volumen promed. en mls.						
Normales	3,88	4,86	4,75	4,20	4,26	3 23
Infectados	4,14	5,75	7,13	6,79	5,97	6 16
Diferencia	— 0,26	— 0,89	—2,38	—2,51	—1,75	—2 93
S	0,51	0,875	1,10	0,949	1,52	1,37
t	2,00	3,71	8 20	10,04	3,24	6,81
P	0,07	0,003	<0,001	<0,001	0,015	<0,001

La simple comparación directa de los dos grupos, es suficientemente clara para hacer notable la diferencia de volumen de líquido alantoideo a favor de los huevos infectados. La estadística ratifica lo expresado por las cifras y consigna significación a las diferencias observadas a partir de las 48 horas, aunque, debe señalarse que la diferencia de las 24 horas, está en el límite de la significación.

En la serie de líquidos alantoideos normales, el volumen máximo alcanzado corresponde a las 48 horas, para luego decrecer lentamente; en los infectados este máximo se muestra a las 72 horas y su reducción es poco notable, llegando recién a las 120 horas a una unidad de volumen que se mantiene todavía a las 144 horas, momento en el cual la diferencia de volumen entre los dos grupos alcanza su más alto nivel.

Los gráficos 9 y 10 destacan los hechos apuntados.

Gráfico 9.

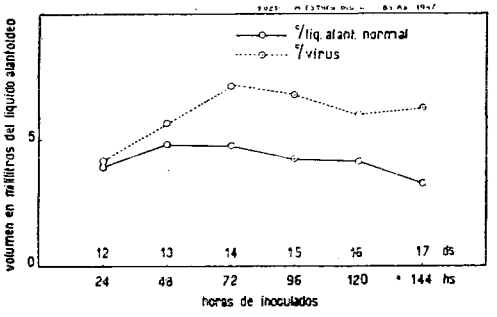
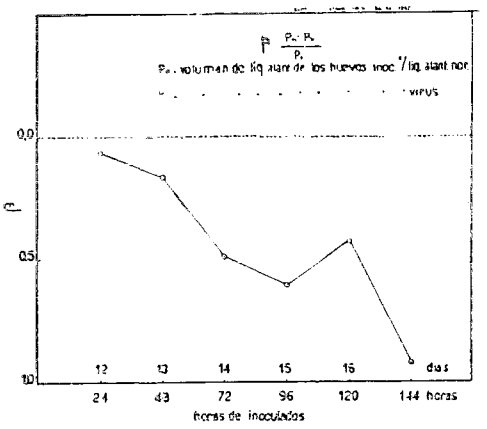


Gráfico 10.



6.° EL VOLUMEN DEL LÍQUIDO AMNIÓTICO

	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	120 hrs	144 hrs.
N.° de grupos	5	5	5	6	3	4
Volumen promed. en mls.						
Normales	2.90	2,10	1,27	1,19	1.45	2,05
Infectados	2,71	1,77	1,35	0,96	1,14	1,31
Diferencia	0,19	0,35	—0,06	0,23	0,31	0,74
S	0,53	0,44	0,944	0,259	0,224	0,981
t	0,81	1,74	0,14	2,30	2,38	1,71
P	0,46	0,16	0,9	0,07	0,14	0,19

El cuadro nos muestra que el volumen de líquido amniótico fué siempre mayor en la serie de huevos normales, menos a las 72 horas, en donde existe una mínima diferencia a favor de los infectados. La diferencia está muy próxima a la significación a las 96 horas, coincidiendo con un valor significativo de su continente, la membrana amniótica. El pequeño predominio de volumen de los infectados a las 72 horas, pierde parte de su valor si recordamos que en ese momento la diferencia de peso entre los huevos normales e infectados era significativa y favorable a estos últimos.

Aquí debemos repetir lo dicho cuando tratamos de las membranas amnióticas, un número mayor de experiencias, sin duda hubiese dado valor estadístico a las diferencias, a las que sólo, de momento corresponde asignarles valor por la tendencia de curvas, como se muestra en el gráfico 11 y su respectivo gráfico 12 de variabilidad, con un único punto discordante a las 72 horas.

Gráfico 11.

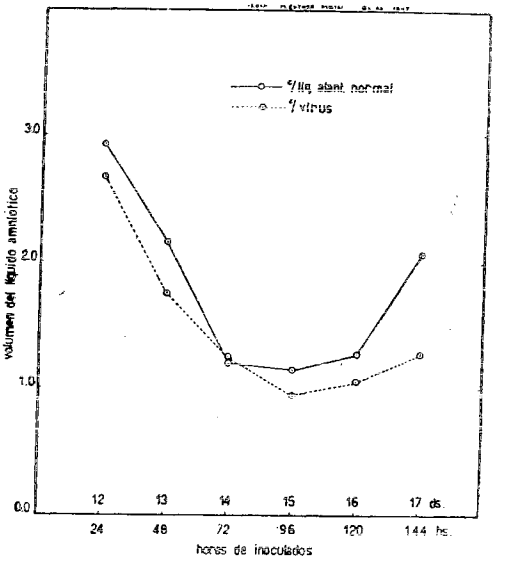
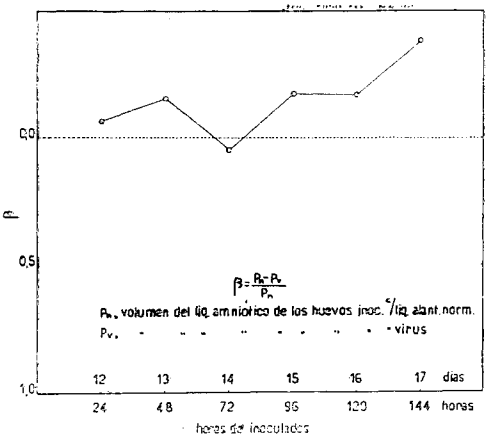


Gráfico 12.



7.° EL PESO DE LA YEMA Y SACO VITELINO

	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	120 hrs.	144 hrs.
N.° de grupos	5	7	7	8	3	4
Peso promedio en gramos						
Normales	17,44	17,12	16,43	16,30	15,57	13,09
Infectados	17,54	17,67	15,86	16,05	16,32	14,44
Diferencia	—0,10	—0,55	0,57	0,25	—0,75	—1,35
S	0,673	0,79	0,72	1,00	0,431	1,60
t	0,33	1,89	2,11	0,71	3,12	1,69
P	0,76	0,10	0,08	0,50	0,09	0,19

El primer hecho que salta a la vista es la tendencia en ambos grupos, a reducir de peso en función del tiempo y en segundo lugar, que cada grupo lo hace en forma diferente. En los normales la reducción es progresiva, en tanto, con los infectados, esta reducción es visible recién a las 72 horas llegando a un nivel inferior al de los normales, que persiste hasta las 96 horas, para luego mantener un nivel superior a éstos.

Esta irregularidad en el comportamiento, era muy manifiesta cuando teníamos realizadas sólo cinco experiencias, y buscando ratificar o rectificar los resultados, se llevaron a cabo los experimentos E 1786 y E. 1809 a). Estos, estudiados estadísticamente en particular, no dieron significación a las diferencias, como tampoco cuando fueron agregados a las experiencias anteriores. El peso de las yemas más saco vitelino de los huevos mostraron en esos experimentos, variaciones tan grandes, que privan de valor a las diferencias que puedan manifestarse en uno u otro grupo.

Los gráficos 13 y 14 destacan los hechos señalados.

Gráfico 13.

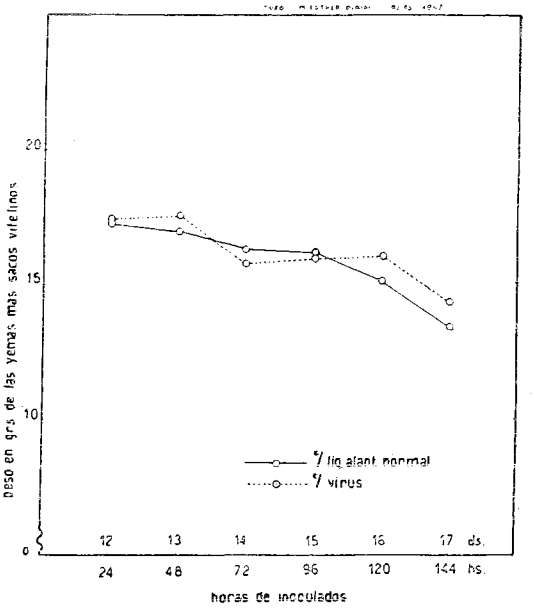
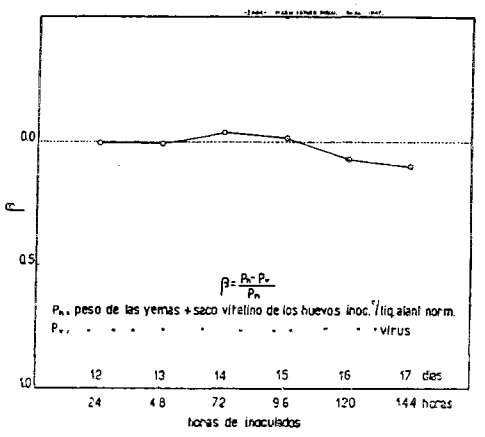


Gráfico 14.



8.° EL PESO DE LA CLARA

	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	120 hrs.	144 hrs.
N.° de grupos	5	7	7	8	3	4
Peso promedio en gramos						
Noemales	9,33	10,30	9,53	9,02	8,16	8,02
Infectados	9,34	10,05	8,91	9,55	8,31	9,19
Diferencia	—0,01	0,25	0,62	—0,53	—0,15	—1,17
S	0,614	0,45	0,44	1,11	1,21	1,58
t	0,037	1,48	3,87	1,36	0,217	1,48
P	0,9	0,18	0,008	0,22	0,9	0,24

Este elemento, como ocurre con la yema, carece de uniformidad en el comportamiento. En los normales la disminución de peso es contínua, aunque sin mantener una proporción. En cambio, esta reducción tiene lugar a las 72 horas, en forma estadísticamente significativa, por parte de los huevos infectados, para luego ser más consumida por los normales.

La diferencia señalada a las 72 horas fué ratificada con la inclusión de los experimentos E 1786 y E 1809 a).

La simple comparación de los promedios, pone de relieve los altibajos de las relaciones guardadas por ambos grupos.

El gráfico 15 y su respectivo gráfico 16 del coeficiente de variabilidad nos dan una idea de los expuesto.

Gráfico 15.

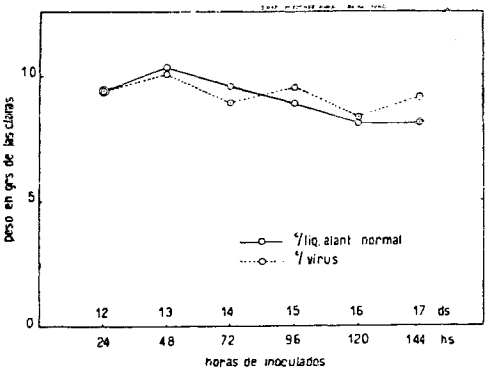
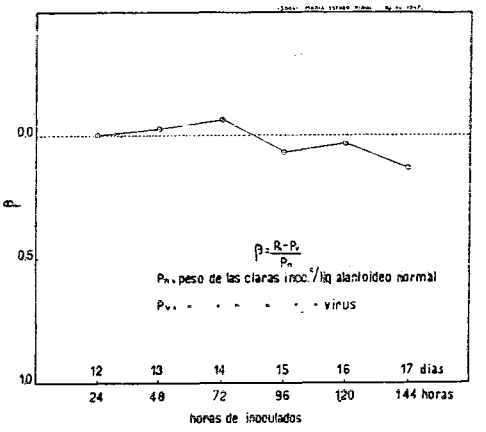


Gráfico 16.



9.° EL PESO DE LA CÁSCARA

	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	120 hrs.	144 hrs.
N.° de grupos	20	20	19	20	13	11
Peso promedio en gramos						
Normales	5,65	5,83	5 83	6,21	6,25	6,56
nfectados	5,68	5,92	6,01	6,26	6,43	6,61
Diferencia	—0,03	—0,09	—0,18	—0,05	—0,18	—0,05
S	0,275	0,25	0,336	0,336	0,274	0,298
t	0,49	1,80	2,27	0,71	2'40	0,56
P	0,62	0,06	0,036	0,40	0,034	0,58

Se exponen en el presente cuadro las cifras correspondientes al peso de las cáscaras que son progresivamente más pesadas en cada grupo, hecho que se explica por corresponder a grupos de huevos de peso creciente. Comparando las dos series en todos los casos, el peso de los infectados predomina. Esta diferencia está en el límite de la significación a las 48 horas, para hacerse significativa a las 72 horas. Debemos señalar que, si bien existe esta significación, tratándose de las cáscaras en general, carece de valor en particular, por los múltiples factores que intervienen en el peso de la cáscara. No debemos olvidar, como lo apuntamos en técnicas, que en el peso de las cáscaras va incluído el de la membrana coclear.

El gráfico 17 hace notable la tendencia de curvas que da valor a las diferencias encontradas, mientras el gráfico 18 del coeficiente de variabilidad nos hace resaltar la tendencia de uno de los dos grupos de huevos, en este caso los infectados.

Gráfico 17.

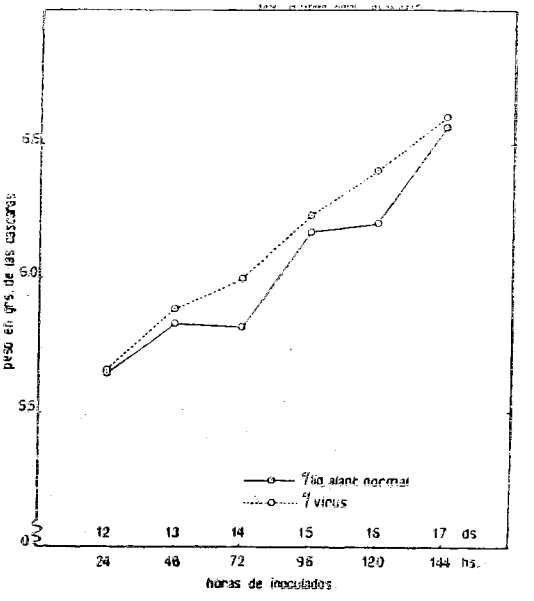
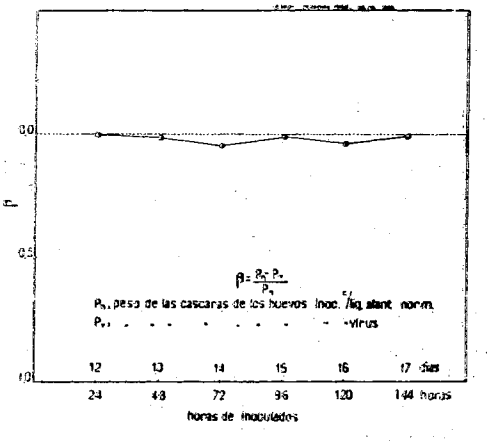


Gráfico 18.



DISCUSIÓN

I Parte

Previos a toda otra consideración, analizaremos dos factores, que aparte de su importancia por el carácter explicativo complementario que tienen, nos proporcionan otros elementos de juicio para una posible interpretación de los resultados, cuyo estudio estadístico fué presentado en el capítulo precedente.

Estos factores son: 1º) El peso de los lotes de huevos empleados, con las modificaciones que sufren durante el transcurso de la incubación, antes y después de inoculados; y 2º) La influencia que tiene sobre el desarrollo del embrión, la inoculación de los huevos con un líquido inocuo (solución fisiológica o solución de líquido alantoideo normal). En otras palabras, si el peso de embriones que hemos considerado normales, era tal en realidad.

1º — En métodos, se hizo una explicación detallada de la forma, cómo se clasificaban y distribuían los huevos en cada grupo, por lo que era de esperarse que la diferencia posible, apareciese ya en un lote ya en otro. Los resultados nos mostraron que a partir de las 48 horas posteriores a la inoculación siempre eran más pesados los lotes de huevos inoculados con virus, llegándose a la máxima diferencia de pesos, a las 72 horas. En una de las primeras experiencias realizadas (25-V-45), quisimos verificar, la pérdida de peso diaria de los huevos inoculados con virus y de normales sin inocular; los primeros con un promedio de peso de 58,10 gramos al ser inoculados perdían 1,17 gramos a las 96 horas, en tanto que los normales con un promedio inferior de 54,64 gramos, al cabo de este tiempo reducían su peso 1,59 gramos; evidentemente, existía entre ambos, una notable desproporción en la pérdida de peso. Esta observación, recién pudo aprovecharse una vez realizado el estudio estadístico del peso de los huevos empleados, el cual reveló que la diferencia significativa comprobada a las 72 horas, no era debida al azar. Debimos repetir experimentos de este tipo, prolongando las pesadas hasta las 120 horas siguientes a la inoculación. Así, el E 1692, que pierde valor, por muerte del 80 % de los embriones, mientras ratificamos el hallazgo primitivo con el E 1791, inoculando un grupo de huevos de peso promedio de 57,52 gramos con virus y otro de 57,19 gramos con solución de líquido alantoideo normal, los cuales arrojaron una diferencia de peso a las 120 horas de 1,82 gramos y 1,98 gramos, respectivamente. Este resultado nos indujo a practicar un nuevo más amplio y detallado experimento, que se expone en el protocolo E 1809 b) en el cual es evidente que la pérdida de peso en ambos lotes desde el comienzo de la incubación hasta el undécimo día, es idéntica. Pero una vez inoculados la reducción de peso es mayor en el grupo inoculado con solución fisiológica. En el cuadro adjunto se muestran las diferencias exhibidas por cada grupo.

E 1809 b)

DIFERENCIA EN GRAMOS CON EL PESO INICIAL A LOS:

Días		11	12	13	14	15	16
Primer grupo	Normales	5,12	—	6,00	—	—	—
	Infectados	5,00	—	5,74	—	—	—
Segundo grupo	Normales	4,93	—	—	6,36	—	—
	Infectados	4,92	—	—	6,09	—	—
Tercer grupo	Normales	5,12	—	—	—	7,04	—
	Infectados	5,07	—	—	—	6,56	—
Cuarto grupo	Normales	4,91	—	—	—	6,96	7,38
	Infectados	4,91	—	—	—	6,41	6,73

En los protocolos también es evidente que la pérdida de peso, no es del mismo grado en todos los huevos, aun entre los de peso igual. Con los datos de este protocolo se ha confeccionado el gráfico 19.

Otro protocolo que nos amplía los datos es el E 1809 a), en el cual vemos que aun siendo grandes las variaciones de los pesos individuales de los huevos, los promedios equilibran las diferencias, uniformando los grupos, pero siempre con una ligera diferencia a favor de los inoculados con virus.

2º — En lo concerniente al segundo punto, en el protocolo del 14 al 18-V-1945, se presentan los resultados de una experiencia, realizada sobre un lote de huevos sin inocular, en los cuales se estudian el huevo entero, los embriones y las cáscaras hasta el décimoquinto día de incubación, representados en el gráfico 20. En las experiencias anteriores y posteriores a ésta, los huevos a los 11 días de incubación eran inoculados, un lote con virus, el otro, para mantener los controles en idénticas condiciones, era inoculado o con solución fisiológica o con una dilución de líquido alantoideo normal. Los resultados obtenidos no difieren prácticamente de los registrados con los huevos sin inocular. Manteniendo gran concordancia con los resultados expuestos por otros autores para el peso de los embriones.

El único autor que ha trabajado con huevos de gallina Leghorn blanca es Murray, cuyos resultados así como los de otros autores son comparables con los nuestros.

Gráfico 19.

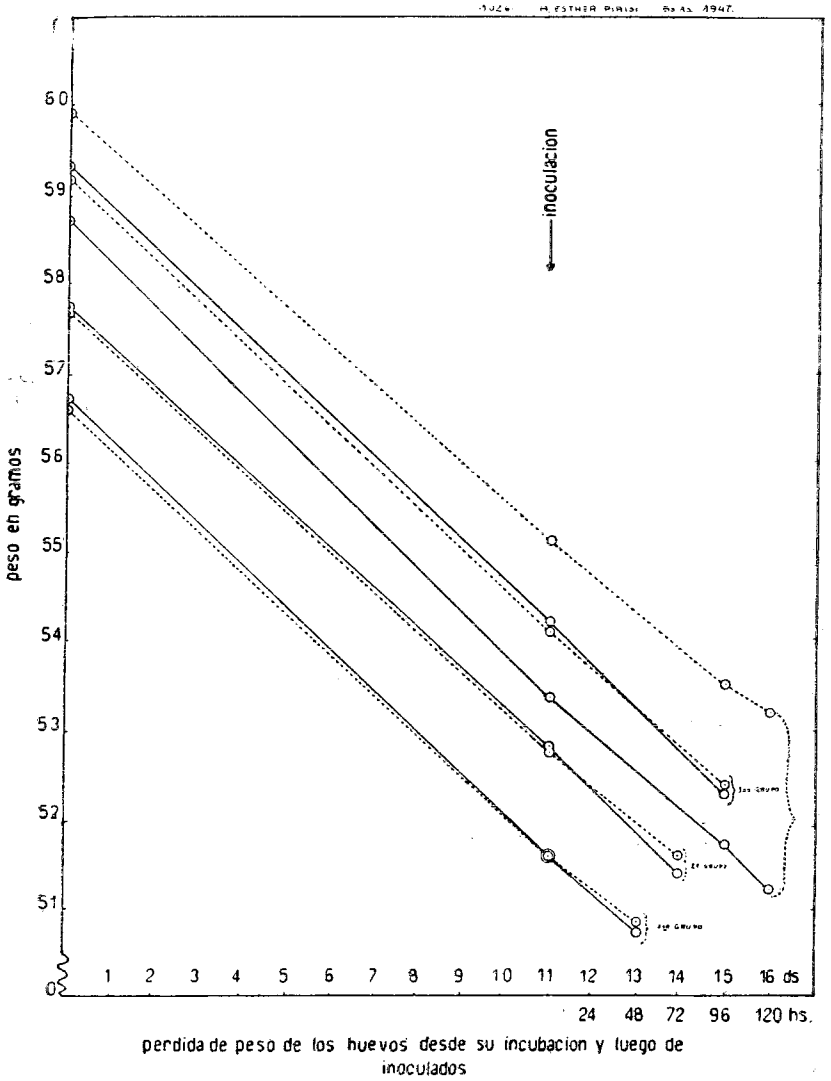
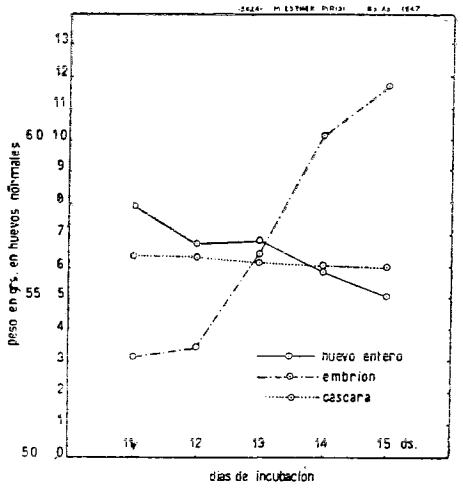

inoculacion
peso en gramos
60
59
58
57
56
55
54
53
52
51
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 ds
24 48 72 96 120 hs.
perdida de peso de los huevos desde su incubacion y luego de inoculados

Gráfico 20.



PESO DE LOS EMBRIONES NORMALES EN HUEVOS

Días de incubación	1	2	3	2 + 3
	Sin inocular gramos	Inoculados con sol. fisiológica gramos	Inoculados con líq. alant. norm. gramos	Inoculados con líq. inocuos en conjunt. gramos
11	3,175	—	—	—
12	3,466	4,297	4,618	4,583
13	6 436	5,711	6,161	6,173
14	10,147	7,301	8,354	8,232
15	11,716	10,827	11,176	11,136
16	—	14,094	13,899	13,913
17	—	—	16,881	16,881
18	—	20,820	—	20,820

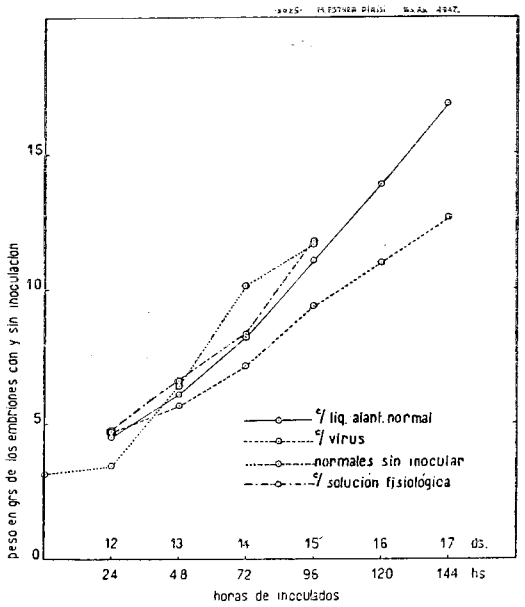
PESO DE EMBRIONES NORMALES

Días de incub ción	Hasselbalch 1900 huevos blanco. gramos	Ijin 1907 gramos	Schmalhausen 1927 gramos	Murray 1926 W. Leghorn gramos	N. resultados W. Leghorn gramos
12	5,674	4,449	4,650	5,105	4,583
13	7,543	6,192	7,430	6,839	6,113
14	10,005	8,009	9,840	8,974	8,232
15	12,285	11,377	11,000	11,460	11,136
16	15,210	14,404	13,650	14,390	13,913
17	17,500	17,089	16,500	17,950	16,881
18	21,545	23,144	20,700	22,030	20,820

En primer lugar exponemos los resultados logrados por nosotros en los diversos grupos y en otro cuadro se ponen éstos frente a los autores a que nos hemos referido.

En el gráfico 21 se establece la comparación entre el peso de los embriones con los distintos inóculos.

Gráfico 21.



Estos resultados certifican, que la inoculación del huevo en desarrollo con un líquido inocuo, como los utilizados, no afecta el normal desarrollo del embrión y si nuestros valores son ligeramente inferiores a los de Murray, es exclusivamente debido a la temperatura inferior a la cual se incubaron luego de inoculados.

Si la inoculación no tiene influencia sobre el desarrollo normal del embrión, es evidente que tampoco la tiene sobre las partes restantes del huevo en desarrollo. Pues la acción ejercida sobre el embrión, indudablemente debe repercutir de una u otra forma sobre sus anexos o viceversa.

Podemos entonces, dejar sentado que nuestros experimentos han sido realizados con controles normales adecuados. Como las cifras logradas son el resultado medio de un gran número de huevos empleados, pueden ser utilizadas como representativas de la evolución del huevo en los días señalados.

II Parte

Los valores que registramos para la membrana corioalantoidea, son muy inferiores a los de Byerly, quien encuentra que el peso de éstas aumenta hasta un máximo de 1,4 grs. en el décimo día de incubación y con pocas variantes llega al nacimiento del pollo. La diferencia observada se explica por la técnica que hemos empleado con las membranas corioalantoidea y amniótica, las cuales antes de ser pesadas eran agotadas de su líquido, por frotamiento sobre papel de filtro. El caso vitelino fué pesado individualmente, sólo a las 24 y 48 horas siguientes a la incubación, en un único experimento E 1378, en razón de la gran dificultad para liberarlo totalmente de los restos de yema; pues con el aumento del período de incubación la yema deshidratándose se torna espesa, viscosa y adherente, fijándose en modo tal, entre las vellocidades y pliegues del saco vitelino, que para desprenderla totalmente, es necesario el lavaje repetido con solución fisiológica. Este proceder nos conduciría a pesadas de la yema, que carecerían de la precisión a que hemos sujetado todas las pesadas de los elementos restantes.

Byerly hace de este tópico un estudio detallado, quien da un peso de aproximadamente 3,5 gramos hacia el décimoquinto día, para luego decrecer hasta cerca de 2,5 grs. en el momento del nacimiento; los resultados que registramos en esa experiencia coinciden con los de este autor, no habiendo observado, entre los grupos de huevos infectados y normales, diferencia significativa. Lo expuesto justifica la razón, de la pesada conjunta de la yema y del saco vitelino. En el capítulo IV, presentamos una serie de gráficos confeccionados con los promedios del total de determinaciones, los cuales se detallan en el cuadro adjunto: y para evidenciar la relación existente entre el

Promedios totales

HUEVOS INOCULADOS CON SOL. DE LÍQUIDO ALANTOIDEO NORMAL

Días de incub.	Horas de inocul.	Enteros grs.	N.º de huevos	Embr. grs.	N.º de huevos	Membr. corial. grs.	N.º de huevos	Membr. amniot. grs.	N.º de huevos	Líquid. alant. cc.	N.º de huevos	Líquid. amniot. cc.	N.º de huevos	Yema y saco vit. grs.	N.º de huevos	Clara grs.	N.º de huevos	Cáscara grs.	N.º de huevos
12	24	48,98	165	4,58	165	0.39	107	0.17	43	3.95	98	2,87	43	17.36	43	9.42	43	5.65	165
13	48	51.18	165	6.11	165	0.37	107	0.20	43	4.89	106	2.08	43	16.95	59	10.29	58	5.83	165
14	72	52.07	156	8.23	156	0.45	106	0.23	42	4.81	114	1.20	42	16.30	58	9.55	58	5.82	156
15	96	54.00	159	11.13	159	0.43	113	0.29	49	4.24	121	1.15	49	16.14	64	8.89	64	6.18	159
16	120	54.77	104	13.92	102	0.37	76	0.33	20	4.19	61	1.27	21	15.01	21	8.07	21	6.21	102
17	144	56.00	90	16.88	90	0.46	90	0.34	35	3.27	86	2.07	35	13.04	35	8.12	35	6.57	90

HUEVOS INOCULADOS CON VIRUS DE INFLUENZA "A"

12	24	48.51	165	4.57	165	0.43	107	0.16	43	4.20	92	2.67	43	17.41	43	9.41	43	5.66	165
13	48	51.42	165	5 72	165	0.43	107	0.18	43	5.69	112	1.75	43	17.55	59	10.03	59	5.89	165
14	72	52.98	156	7.19	156	0.54	106	0.21	42	7.17	114	1.25	42	15.77	58	8.91	58	6.00	156
15	96	54.35	159	9.41	159	0.47	113	0.24	49	6.81	113	0.95	49	15.92	64	9.51	64	6.24	159
16	120	54.82	105	11.03	105	0.37	80	0.28	24	5.97	72	1.05	24	16.05	24	8.33	24	6.41	105
17	144	56.06	90	12.72	90	0.36	90	0.28	35	6.29	82	1.27	35	14.32	35	9.17	35	6.61	90

HUEVOS INOCULADOS CON LÍQUIDO ALANTOIDEO NORMAL

		24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	120 hrs.	144 hrs.
Huevos enteros	Grs.	48.93	51.18	52.07	54.00	54.77	56.00
Embriones	%	9.35	11.94	15.80	20.61	23.59	30.14
Membrana corioalentoidea	%	0.79	0.72	0.86	0.79	0.67	0.82
Membrana amniótica	%	0.34	0.39	0.44	0.53	0.60	0.61
Líquido alantoideo	%	8.06	9.55	9.23	7.85	7.65	5.83
Líquido amniótico	%	5.86	4.06	2.30	2.13	2.32	3.69
Yema y saco vitelino	%	35.44	33.11	31.30	29.88	27.40	23.28
Clara	%	19.23	20.10	18,34	16,28	14,73	14,50
Cáscara	%	11.53	11.38	11.18	11.44	11.35	11.76

HUEVOS INOCULADOS CON VIRUS

		24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.	120 hrs.	144 hrs.
Huevos enteros	Grs.	48.51	51.42	52.98	54.35	54.82	56.06
Embriones	%	9.42	11.12	13.57	17.31	20.12	22.69
Membrana corioalentoidea	%	0.88	0.83	1.01	0.86	0.67	0.64
Membrana amniótica	%	0.35	0.35	0.39	0.44	0.51	0.49
Líquido alantoideo	%	8 65	11.06	13.53	12.53	10.89	11.22
Líquido amniótico	%	5.50	3.40	2.36	1.74	1.91	2.23
Yema y saco vitelino	%	35.88	34.12	29.76	29.29	29.27	25.54
Clara	%	19.39	19.50	16.81	17.49	15.19	16.35
Cáscara	%	11.64	11.45	11.32	11.48	11.69	11.79

huevo total y cada uno de sus constituyentes, estos promedios traducidos en por cientos se exponen en un cuadro, y están representados en la figura 1 la cual proporciona una vista conjunta de las desviaciones que tienen lugar en cada grupo de huevos.

Jull trabajando sobre la variabilidad de los pesos de las distintas partes del huevo no fertilizado, encontró que el factor menos variable era el peso del huevo, ligeramente más variable que éste, el peso de la clara, considerablemente más variable que ésta, el peso de la yema y en último término como el factor más variable, el peso de la cáscara. Esto da a entender como si se produjese un mecanismo compensatorio durante el proceso de formación del huevo; correspondiendo a yemas grandes, claras pequeñas e inversamente a yemas pequeñas, claras grandes, desde que el peso del huevo entero no varía tanto como ocurre con cada uno de sus componentes.

Nosotros hemos observado que estas variaciones, también son notables en el huevo en desarrollo y no solamente circunscriptas a estos elementos sino que extendidas a los restantes.

Por lo general, a los huevos de más peso corresponde un peso mayor a cada uno de sus constituyentes, pero esta proporcionalidad no se verifica, cuando se considera cada huevo en particular o cada

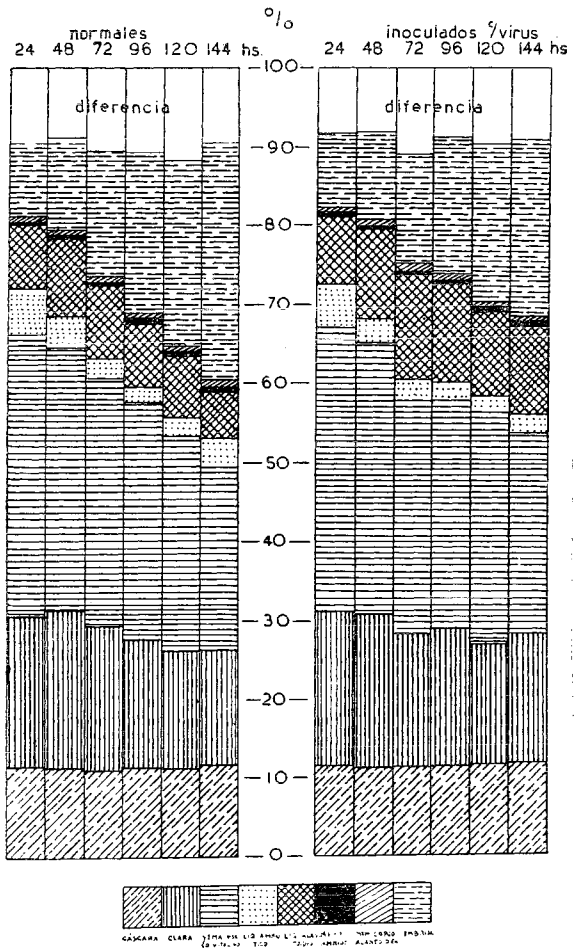

%
normales
24 48 72 96 120 144 hs.
inoculados % virus
24 48 72 96 120 144 hs
diferencia
diferencia
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CASCARA
CLARA

Figura 1

una de sus partes. En nuestros protocolos queda claramente establecido que la relación guardada por cada constituyente respecto del huevo total, mantiene una relativa independencia; esta independencia hace difícil establecer conclusiones, si las desviaciones individuales no se consideran como variaciones frente al promedio de un gran número de experiencias y también porque estas diferencias individuales, difieren con los distintos días en los cuales se han hecho las observaciones.

Pero es evidente, que en los huevos normales, en general, la variación unitaria de los diversos componentes es menor y más regular (embrión, membranas corioalantoidea y amniótica, líquidos alantoideo y amniótico y cáscaras) salvo en los casos de la yema y de la clara, donde las desviaciones son del mismo grado que en los huevos infectados con virus.

En lo concerniente a los huevos infectados, es notoria la irregularidad individual de cada elemento, que respecto a los normales y aun con los de su mismo grupo, hacen particularmente manifiesta la autonomía y la eventual isocronía en el desarrollo.

III Parte

1º — Como lo establece el análisis estadístico, los grupos de huevos (normales e infectados) con los cuales fueron realizadas las experiencias, son comparables, si se tiene en cuenta el número considerable de huevos que han entrado en el promedio, aún la diferencia significativa, a favor de los infectados, observada a las 72 horas de inoculados no hace sino dar más valor y poner más en evidencia las variaciones negativas de las diversas estructuras del huevo en desarrollo.

2º — Los embriones infectados mantienen un peso notablemente inferior a los normales a partir de las 48 horas y que la diferencia tiene desde este momento en adelante, valor estadístico. En los seis días de observación, los normales que representan el 9,35 % del peso total del huevo, llega a ser el 30,14 %, en tanto que los infectados, del 9,42 % alcanzan a ser el 22,69 %; es decir, mientras los normales han aumentado el 21,81 %, los infectados tan sólo el 13,27 %, en otras palabras, entre ellos media a favor de los normales un incremento del 7,45 %.

En el gráfico 22 se han inscripto los coeficientes del crecimiento de los embriones de ambos grupos, lográndose el trazado de dos curvas de tipo Minot, aproximadamente paralelas, en las cuales se destaca en primer término, la reducción del incremento de desarrollo del embrión y en segundo lugar, que entre las 120-144 horas se pone de manifiesto la tendencia de los embriones infectados, a acercar su coe-

ficiente de crecimiento al de los normales, concordante con lo que se observa en el gráfico 5 del coeficiente de variabilidad.

3º — Las membranas corioalantoideas de los huevos infectados se presentaron más gruesas, rojas y pesadas que en los normales desde las 24 horas, alcanzando significación la diferencia entre las 48 y 96 horas, para a las 120 horas desaparecer la discrepancia entre los dos

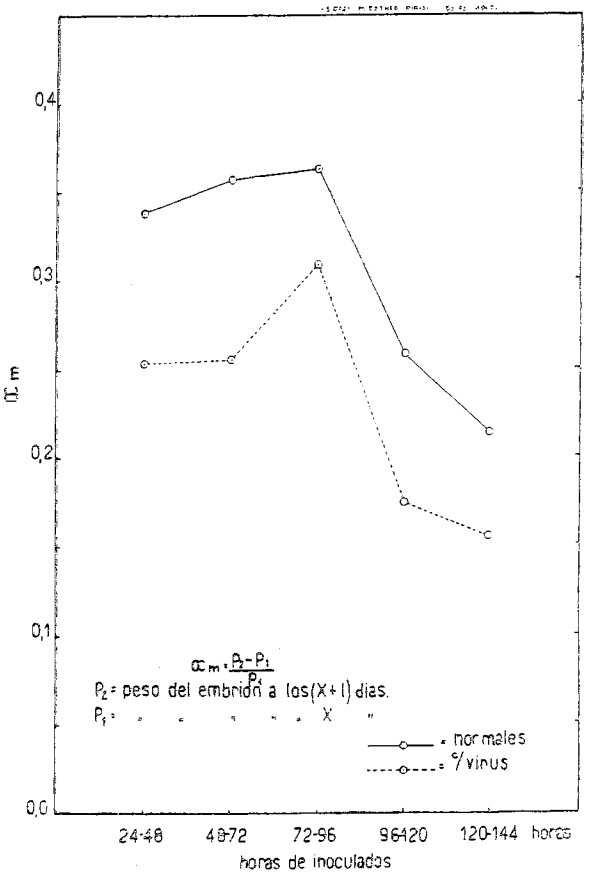


Gráfico 22.

grupos y finalmente a las 144 horas establecer un saldo significativo a favor de las membranas corioalantoideas normales.

4º — Como era de esperar, coincidiendo con embriones más pequeños, las membranas amnióticas de los huevos infectados, se encontraron reducidas proporcionalmente en su desarrollo. La divergencia progresiva entre las membranas normales y las infectadas, permite asignarles el valor que sólo se revela estadísticamente a las 96 horas.

5º — También es lógica, la concomitante reducción del volumen de líquido aminótico, que alcanza su máximo a las 96 horas, y correspondiendo al valor significativo arrojado por el peso de la membrana amniótica. Aunque estadísticamente ninguno de los valores registrados alcanza la probabilidad base, debe concederse valor a la tendencia observada por las curvas de los volúmenes en ambos grupos.

6º — El líquido alantoideo, es otro de los elementos cuyo comportamiento en ambos grupos de huevos es bien diferente. El volumen correspondiente a los infectados en todos los casos es mayor, con valores significativos a partir de las 48 horas. Mientras en los huevos normales representa el 8,06 % del peso del huevo, a las 24 horas, alcanzando su máximo de 9,55 % a las 48 horas, para disminuir hasta significar tan sólo el 5,83 % a las 144 horas, vale decir, -3,72 % y -2,23 % que los volúmenes máximo e inicial; en los infectados este volumen es de 8,65 % a las 24 horas, llega a su máximo de 13,53 % a las 72 horas y es el 11,22 % a las 144 horas, con una diferencia de -2,31 % y de + 2,57 % para los volúmenes máximo e inicial respectivamente. La diferencia entre los dos grupos es a las 72 horas de 4,30 % y a las 144 horas es de 4,80 %. Estos datos destacan la diferencia en el proceso de reducción del volumen de este líquido en los dos grupos. Computamos la unidad de volumen como 1 gramo, pues la densidad de este líquido es de 1,007.

7º — En este párrafo trataremos de uno de los elementos cuya variabilidad individualmente considerada es muy grande, la yema; que nosotros hemos pesado junto con el saco vitelino, pero a estar por los datos de Byerly, este elemento varía muy poco, por lo tanto las máximas oscilaciones indudablemente corresponden a la yema. En los protocolos E 1378, E 1786 y E 1809 a) se exponen las pesadas individuales de este elemento pudiendo apreciarse las cifras extremas que registran. Esta gran irregularidad individual se ve reflejada en los distintos grupos. Pero la tendencia general es a reducirse con el progresar de la incubación, de tal modo que la única diferencia apreciable es la más rápida reducción por parte de los infectados a las 72 horas, pero luego es más lenta que en los normales, así que a las 144 horas el peso de la yema y saco vitelino de los huevos infectados corresponde al 25,54 % de éstos y en los normales al 23,38 %, es decir, una diferencia de -2,16 %. El análisis estadístico, no dió ningún valos a las diferencias en virtud de la gran variación individual.

8º — La clara, ofrece un comportamiento tan irregular como el que hemos observado con la yema, con un solo hecho notable: la clara de los huevos infectados pesa a las 72 horas significativamente menos que la de los huevos normales, y coincidente con el volumen máximo de líquido alantoideo. El consumo de este material de reserva es en los huevos infectados durante todo el período de la experiencia muy variable, pero excepto a las 72 horas, siempre en cantidades inferiores a la consumida por los normales.

9º — El peso individual de las cáscaras, ofrece respecto al peso total del huevo, grandes fluctuaciones y que si bien a los huevos más pesados corresponden cáscaras también más pesadas, este hecho no se cumple regularmente. Pues sea por razones de cría, alimentación, edad de las ponedoras, estación, etc., existen grandes variaciones aún en huevos de pesos iguales, pero estas diferencias se suprimen cuando se opera con grandes lotes de huevos.

Los resultados muestran el predominio del peso de las cáscaras de los huevos infectados el que tiene valor estadístico a las 72 y 120 horas y puede extenderse el valor por la tendencia de las curvas de peso. La irregularidad de los pesos individuales resta valor estadístico si las cáscaras son consideradas en particular, por los hechos referidos más arriba; pero este valor es pleno cuando se las considera en general.

Como es sabido, la cáscara no desempeña exclusivamente el papel de coraza o elemento protector, sino que también oficia como fuente de sales minerales de calcio, de las que ha de aprovechar el embrión para la constitución de su esqueleto. A este respecto hemos observado tal como era de presumir, que el peso de las mismas en los huevos infectados es mayor que en los normales, hecho que pone de manifiesto la alteración o reducción del uso de esta fuente de calcio.

IV Parte

Con los resultados alcanzados en los distintos experimentos realizados, trataremos de delinear una explicación, sin más pretensión que el de su carácter provisorio, porque es indudable que aún faltan experimentos de diversa categoría para aclarar una serie de puntos oscuros, también involucrados en el complejo mecanismo de la patogenia del virus A de Influenza en el huevo de gallina en desarrollo.

Pasaremos una breve revista de los puntos establecidos.

A. —

1º. Los huevos infectados pesan más.
2º. Los huevos inoculados con solución fisiológica pierdan más peso.
3º. Los embriones infectados pesan menos.
4º. Las membranas corioalantoideas infectadas pesan más.
5º. El volumen de líquido alantoideo de los huevos infectados es mayor.
6º. La membrana amniótica de los huevos infectados pesa menos.
7º. El volumen de líquido aminótico de los huevos infectados es menor.
8º. El peso de la yema y saco vitelino es irregular.
9º. El peso de la clara es irregular.
10º. El peso de las cáscaras de los huevos infectados es mayor.

B. —

En trabajos anteriores se intentó una sencilla explicación mecánica, merced a las modificaciones del intercambio gaseoso observadas en los huevos inoculados con virus; el espesor de la membrana corioalantoidea causaría la reducción del intercambio gaseoso (O_2 y CO_2) produciéndose una anoxia del embrión y explicaría el elevado pH de los líquidos alantoideos, debido a una acumulación de carbonatos. El sentido contrario seguido por las diferencias entre los embriones y los líquidos alantoideos, hizo pensar que el exceso de volumen de líquido alantoideo provenía de los embriones, produciéndose por causas ignoradas un transtorno del metabolismo acuoso. Pues si se sumaban los volúmenes de los líquidos alantoideos a los de los embriones se tenían cifras prácticamente idénticas.

C. —

Recordemos que la cavidad alantoidea está limitada por las hojas externas e interna de la membrana coriolantoidea; que al efectuarse la inoculación de virus en esta cavidad, éste al difundirse, encuentra como primeros elementos celulares que invadir o infectar, los correspondientes a estas hojas. La membrana coriolantoidea reacciona precozmente, (peso a las 24 horas) con fenómenos inflamatorios e hiperplásticos difusos (con los Dres. D. Vívoli y A. S. Parodi están realizándose estudios histopatológicos de estas membranas), presentándose más gruesa (edematosa), roja (congestiva) y de peso mayor que la normal.

Es sabido que una de las funciones principales de esta membrana, consiste en establecer el intercambio gaseoso (respiración embrionaria) entre la circulación embrionaria y la propia que por su posición parietal a través de la cáscara (recordemos que era muy porosa), recibe el O_2 y elimina el CO_2 y que por ser una membrana que cubre casi totalmente la pared del huevo, indudablemente debe estar implicada en los procesos de evaporación, los cuales deben realizarse a su través consecutiva o simultáneamente con el intercambio gaseoso.

Otras de las funciones de la membrana coriolantoidea son la de intervenir en la absorción de la clara, y de las sales de calcio contenidas por la cáscara, que ha de utilizar el embrión para constituir su esqueleto.

Con estos antecedentes trataremos de desarrollar una interpretación de las modificaciones observadas en el huevo de gallina en desarrollo e inoculado con virus "A" de Influenza, ampliando la hipótesis anterior con los nuevos datos aportados.

La importanica fisiológica de la membrana corioalantoidea está directamente reflejada en las diversas funciones que desempeña durante el período de la incubación y por dependencia funcional mantenidas por otras estructuras respecto de ella. Toda lesión anatómica de esta membrana repercute indudablemente sobre la integridad de

su funcionamiento y consecutivamente sobre aquellos elementos cuya fisiología y evolución están conectados con éste.

A la reacción inflamatoria causada en la membrana corioalantoidea por la infección viral siguen alteraciones de diversa índole, comprometiendo su fisiología normal. Entre ellas, perturbaciones circulatorias (lógicas consecuencias de la inflamación) que se traducen en modificaciones del recambio gaseoso y de la evaporación, alteración de la función absorbente de la clara y de las sales de calcio de la cáscara. Este último hecho hace más difícil el transporte gaseoso y la evaporación. Pues es sabido que en condiciones normales, la cáscara cede sales de calcio, pierde peso, reduciendo su espesor y aumentando su porosidad. Pero como hemos visto, en nuestros experimentos la pérdida de peso en las cáscaras de los huevos infectados es inferior a la de los normales. A estos trastornos siguen, una menor pérdida de peso, reducción del crecimiento del embrión y coincidentemente del amnios y su contenido de líquido amniótico, una mayor acumulación de líquido alantoideo y finalmente aprovechamiento inferior e irregular de los componentes nutritivos, yema y clara.

Claro está, que esta explicación es pasible de objeciones lógicas desde que existen algunos puntos oscuros. Entre ellos el referente a la diferencia de peso de los huevos, cuya única razón, no es sin duda la menor evaporación, pues de serlo equivaldría admitir que a partir de las 72 horas de inoculados, ésta es más acelerada en los huevos infectados que en los normales, cosa que no ocurre como lo demuestran las experiencias. En cambio, la menor evaporación podría justificar la acumulación de líquido alantoideo, testigo del gran trastorno en el metabolismo hídrico.

Otros puntos atacables son los concernientes a la utilización de la yema y de la clara, para los cuales toda explicación que ensayemos no dejaría de ofrecer claros, desde que no nos es posible comprender el irregular comportamiento así como tampoco las variaciones que muestran en el curso de las experiencias, particularmente notables en el caso de la clara.

Todas estas modificaciones son indudablemente imputables al dismetabolismo, ocasionado por la infección viral.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en las experiencias, cuyos protocolos transcribimos, permiten sentar las siguientes conclusiones:

1º — Que ambos grupos de huevos empleados uno para la inoculación con virus A de Influenza y el otro utilizado como contralor, e inoculado con solución de líquido alantoideo normal son comparables.

2º — Que la diferencia observada a favor de los huevos inoculados con virus tiene valor estadístico únicamente a las 72

horas siguientes a la inyección; este hecho da más valor a las diferencias comprobadas en esa hora para los elementos cuyo peso está reducido.

3º — Que no siendo imputable esta diferencia, al azar, debe culparse al tratamiento del huevo con virus.

4º — Que la inoculación de los huevos con un líquido inocuo (solución fisiológica o solución de líquido alantoideo normal) no afecta el desarrollo del embrión y sus anexos.

5º — Que los valores del peso de los embriones que hemos computado como normales, concuerdan con los obtenidos por otros autores en huevos sin inocular. Por esta razón, pueden considerarse como valores normales del desarrollo del embrión, en esos períodos de incubación.

6º — Confirmamos que el peso de los embriones infectados con virus es "significativamente" inferior al peso de los embriones normales a partir de 48 horas de inoculados. La diferencia es progresiva hasta las 144 horas.

7º — Que el peso de los embriones, considerados individualmente, tanto en el grupo de los inoculados con virus, como en los normales es independiente del peso total del huevo y en cierto grado, del tiempo de incubación; este último hecho es más notorio en el grupo de huevos inoculado con virus.

8º — Confirmamos, que el peso de las membranas corioalantoideas de los huevos inoculados con virus, es mayor que el de los normales a partir desde las 24 horas, adquiriendo esta diferencia, significación estadística a partir de las 48 horas hasta las 96 horas de inoculados, igualándose los pesos a las 120 horas, para pesar "significativamente" más los normales a las 144 horas; vale decir, que se invierte el fenómeno. Nuestros resultados, arrojan una diferencia bien manifiesta a las 24 horas.

9º — Que el peso de la membrana armniótica, de los huevos infectados con virus es, durante toda la experiencia, inferior al peso de las de los huevos normales correspondientes. Esta diferencia tiene significación estadística a las 96 horas siguientes a la inoculación.

10º — Confirmamos, que el volumen del líquido alantoideo es siempre en el grupo de los huevos infectados, mayor que en los los normales. Estando la diferencia entre ambos grupos en el límite de la significación a las 24 horas de la inoculación, haciéndose extraordinariamente significativa en adelante. El máximo de producción del líquido alantoideo es alcanzado en el grupo de huevos normales a las 48 horas, en cambio, en los infectados lo es a las 72 horas.

11º — Que el volumen de líquido amniótico es superior en los huevos normales que en los infectados con virus, pero si

bien las diferencias no son estadísticamente significativas, la curva de volúmenes seguida por ambos grupos da valor a las diferencias halladas.

12º — Que la yema y saco vitelino conjuntamente, tienen un comportamiento muy variable en los huevos infectados. En los normales, la reducción de peso es paulatina mientras que los infectados, predominando durante las primeras 48 horas, entre las 72 y 96 horas dan valores inferiores a los normales, para luego en adelante volver a predominar. Dada la gran variación individual, estas diferencias carecen de sigficación.

13º — Que la clara, iniciándose con un peso igual en normales e infectados, en estos últimos es inferior desde las 48 horas, alcanzando significación estadística a las 72 horas, coincidiendo con el máximo volumen de líquido alantoideo. En adelante el peso de la clara en los huevos normales es inferior al de los infectados.

14º — Que el peso de las cáscaras iniciándose igual en ambos grupos, después pesa más en los huevos infectados que en los normales, La diferencia de peso es significativa a las 72 y 120 horas.

15º — Que los huevos, a partir del momento que se inicia la incubación pierden una parte notable de su peso hasta el 11º día, en el cual son inoculados y desde entonces la pérdida de peso de los huevos infectados es algo menor que la que tiene lugar en los huevos inoculados con solución fisiológica.

16º — Que las modificaciones observadas son causadas por la acción del virus, alterándose la proporción de los diversos elementos y consecuentemente las relaciones que guardan en condiciones normales.

BIBLIOGRAFÍA

LESBRE F. X. — "Precis d'anatomie comparée des animaux domestiques. París, 1922.

LESBRE F. X. — "Elements d'histologie". París, 1903.

BERNAL E. — Manual de histología normal. Madrid, 1921.

CHAMPY C. — Manual d'embriologie. París, 1921.

LILLIE F. R. — The development of the chick. New York, 1940.

PATTEN B. M. — The early embriology of the chick. Philadelphia, 1943.

NEEDHAM J. — Chemical embriology, 3 tomos. Cambridge, 1931.

NEEDHAM J. — Biochemistry and morphogenesis. Cambridge, 1942.

SANZ VÁZQUEZ C., TAMARIT TORRES J. — El método estadístico en biología. Madrid, 1942.

UDNY YULE G., KENDALL M. G. — An introduction to the theory of statistics. London, 1940.

BARROT H. G. — The effect of temperature, humidity and other factors on hatch of hen's eggs and on energy metabolism of chick embryos. United States Department of Agriculture. Washington D. C. March, 1937.

BYERLY T. C. — Growth of the chick embryo in relation to its food supply. Journ. Biol., 1932, **9**, 15.

JULL M. A. — Poultry Science, 1923,3-80 (sit Needham).

MURRAY H. A. (Jr.). — Physiological ontogeny A. chick embryos. II. Catabolism. Chemical changes in fertile eggs, during incubation selection of standard, condition. Journ. ener. Physiol., 1926, **9**, 1.

MURRAY H. A. (Jr.). — Physiological ontogeny. A. chick embryos. III. Weight and growth rate as functions of age. Journ. Gener. Physiol., 1926, 9, 39.

PARODI A. S., PENNIMPEDE F. C., LAJMANOVICH S., MITTELMAN N. — Disminución ponderal del embrión de pollo por la infección con virus "A" de Influenza. Ciencia e Investigación, 1947, 3, 392.

PENNIMPEDE F. C., PARODI A. S., LAJMANOVICH S., MITTELMAN N. — Modificaciones producidas en el huevo fértil de pollo por la inoculación del virus "A" de Influenza. I. Distribución del virus. (En prensa).

MITTELMAN N., LAJMANOVICH S., PARODI A. S., PENNIMPEDE F. C. — Id. II. Consumo de oxígeno y producción de anhidrido carbónico (En prensa).

LAJMNOVICH S., MITTELMAN N. PARODI A. S., PENNIMPEDE F. C. — Id. III. Volumen y pH del líquido alantoideo. (En prensa).

PARODI A. S., PENNIMPEDE F. C., LAJMANOVICH S., MITEELMAN N. — Id. IV. Peso de los embriones y membranas corioalantoideas. Conclusiones. (En prensa)

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

WARREN D. C., CONRAD R. M. — Growth of the hen's ovun. Journ. Agric. Res. 1939, **58**, 12.

The Research Staff of United States Navy Medical Research Unit N° 1 Barkeley. Studies on the pH and Eh of normal and influenza-infected eggs. Jour. Gener. Physiol., 1945, **28**, 585.

HENLE W., HENLE G. — The effec of ultraviolet irradiation on various properties of influenza viruses. J. Exp. Med., 1947, 85, 347.

BEVERIDGE W. I. B., BURNET F. M. — The cultivation of viruses and rickettsias in the chick embryo. Medical Research Coundil London, Special Report Series N° 256, 1946.