

Metabolismo de las membranas corioalantoideas de embrión fértil de pollo infectado con virus "A" de influenza

I Glicolisis anaerobia

por A. S. Parodi* y S. Lajmanovich

El medio de cultivo de los virus es la célula viva y por lo tanto es lógico suponer que su reproducción incida en el metabolismo de la célula, alterándolo o modificándolo cuantitativamente o cualitativamente. Varias afirmaciones apoyan esta afirmación; así Víctor y Huang (1) encuentra una disminución de la glicolisis anaerobia de los cultivos de tejidos infectados con virus de encefalitis equina tipo Oeste, y Racker y colaboradores (2) demostraron que hay una disminución de la glicolisis en el tejido nervioso de ratones enfermos con poliomiélitis (cepa Lansing) y de sus homogeneizados. Howe y Mellor (3) a su vez encuentra una disminución de la citocromo oxidasa mientras dura el período de resistencia de la célula nerviosa al virus de la poliomiélitis debido al traumatismo del nervio. En cuanto al virus de influenza se ha observado en el huevo fértil de pollo varias modificaciones que hacen pensar en una alteración metabólica importante producida por la infección (4).

Con el objeto de poder precisar mejor el tipo y sitio de las alteraciones hemos iniciado un estudio del metabolismo de los tejidos del embrión.

MATERIAL Y MÉTODO

Se usaron embriones de pollo Leghorn incubados 11 días a 39°C. e inoculados entonces con 0,1 cc. de virus A de influenza, cepa 7 aislada de una epidemia local (4). Una vez inoculados se incubaron a 36°C. hasta el momento en que se usaban para la determinación de la glicolisis.

(*) Jefe de la Sección Virus del Instituto Bacteriológico "Dr. Carlos G. Malbrán", Secretaría de Salud Pública de la Nación.

La glicolisis anaerobia se midió con el aparato de Barcroft-Warburg a 36°C. en las siguientes condiciones.

Las membranas eran extraídas del huevo fértil controlándose antes la vitalidad del embrión y la presencia de virus en los líquidos alantoideos por medio de la aglutinación de eritrocitos de pollo. En los líquidos alantoideos de embriones de pollo inoculados 16 horas antes con el virus de influenza sólo excepcionalmente se registró aglutinación pero la inoculación de la suspensión de membrana a ratones demostró que tenía una gran cantidad de virus.

Una vez extraídas las membranas se lavaban en solución fisiológica pasándolas por 3 cajas de Petri distintas, cortándolas en trozos aproximadamente de 10 mm. de diámetro, cuando estaban en la segunda caja. Esta operación se hizo a veces en forma simultánea con las membranas normales y las infectadas, otras veces primero las infectadas y luego los controles y viceversa. Después de lavadas las membranas eran colocadas en los vasos del aparato de Warburg que contenían solución de Ringer Krebs bicarbonatada y el brazo lateral 0,2 cc. de glucosa 0,1 M totalizando un volumen de 2 cc.

Se hacía pasar entonces una corriente de N₂ 95 % y CO₂ 5 % durante 5-7 minutos y luego se colocaban en el baño. A los 15 minutos se volcaba la glucosa y se comenzaba la lectura a la media hora después de esta mezcla. La lectura se hacía generalmente a las 2 horas pero en algunos experimentos a la hora u hora y media.

Hecha la lectura final las membranas se lavaban en agua destilada y se secaban a 105°C. durante 2 horas, determinándose luego su peso seco.

Los valores están dados en por hora y por mgr. de peso seco de membrana.

Algunos controles se llevaron a cabo con trozos de la misma membrana en presencia y ausencia de glucosa.

Se titularon en ratones blancos la cantidad de virus de algunas membranas en distinto período de tiempo de inoculación calculándose un título por el método de Reed y Muench (6).

RESULTADOS

Las membranas fueron analizadas con la técnica arriba descrita a las 16, 40, 72 y 96 horas de haber sido inoculadas con el virus. A las 16 horas (cuadro 1) encontramos valores de \bar{Q} CO₂ CO₂/h/mgr. de 3,13 para las membranas controles y de 3,57 para las infectadas. Aunque hay evidentemente un aumento de la glicolisis anaerobia en las infectadas, ésta no es significativa posiblemente por el escaso número de observaciones. En cambio a las 40 horas el aumento es evidente dando valores de 2,84 y 4,87 para controles e infectadas respectivamente. A pesar de las variaciones individuales que se observan, especialmente en el grupo de las infectadas, las diferencias de los promedios son estadísticamente significativas.

La diferencia entre ambos grupos se atenúa pero persiste a las 72 y 96 horas de inoculadas, aunque no son probablemente significativas. (Gráfico 1).

En el grupo de membranas en que se midió el desprendimiento de CO_2 en presencia o ausencia de glucosa, usando trozos de la misma membrana se observó que éste era mayor en presencia de glucosa, tanto en las normales como en las infectadas, aunque mucho mayor en estas últimas. No damos las cifras del término medio para los valores de membranas sin glucosa por el escaso número en que se ha hecho la determinación y porque las variaciones individuales no nos permiten afirmar si hay diferencia entre las normales e infectadas (cuadro 2).

La titulación in vivo de las membranas demostró que a las 16 horas había una gran cantidad de virus en ellas y que éste aumentaba hasta las 24-48 horas comenzando luego a disminuir ligeramente (cuadro 3).

DISCUSIÓN

Si se comparan nuestros resultados referente a la glicolisis anaerobia de la membrana corioalantoidea infectada con virus A de influenza con los resultados obtenidos por Racker y Krinsky al estudiar la interacción entre algunos virus (influenza entre ellos) y homogeneizados de cerebro normal de ratón se observa que las conclusiones parece ser antagónicas. En nuestro caso la presencia del virus provoca aumentos de la glicolisis anaerobia, en el de Racker produce una inhibición de la misma. A veces ese respecto vale la pena insistir en que ambos resultados se refieren a casos que momentáneamente se debe considerar diferentes, pues mientras Racker estudia la acción in vitro del virus sobre homogeneizados de cerebro de ratón (tejido en el que el virus de influenza no se reproduce), nosotros estudiamos la alteración in vivo, provocada por la interacción entre célula y un virus que se multiplica en ellas.

El hecho que a las 16 horas no sea significativa la diferencia a pesar de que existe en la membrana una gran cantidad de virus, reproduciéndose activamente y que esta diferencia se hace significativa tan sólo a las 40 horas hace pensar que este fenómeno no está ligado a la reproducción del virus y podrá ser más bien un efecto secundario provocado por la injuria mecánica de la célula por el virus. También podría deberse a la presencia, durante esas horas, en las membranas de otros tipos de células (focos mono-linfocitarios y homorrágicos con distinta capacidad glicolítica que las normales pero estos elementos se encuentran a las 72-96 horas de la inoculación como lo demuestran los estudios anatomopatológicos (7).

Es probable que la diferencia aumente mucho recién a las 40 horas en razón del número de células infectadas o de la cantidad de

40 horas de inoculación

Duración del Exp. minutos	Peso seco membranas mgs.	Nº	Peso seco membranas mgs.	Cupa 7**
45	6.8	3.33	6.0	4.75
"	15.0	2.65	9.4	4.85
90	11.4	1.85	12.8	3.61
"	9.4	1.79	11.8	3.84
"	4.5	3.42	3.6	8.32
"	4.6	2.90	3.1	7.53
"	4.4	3.55	4.9	3.63
"	3.7	3.49	4.7	4.14
120	4.7	2.08	7.9	2.48
"	4.6	2.48	3.2	3.26
"	8.6	4.35	10.6	4.63
"	9.0	3.30	12.1	4.26
"	5.7	2.14	6.5	3.54
"	6.7	2.28	4.6	4.20
"	7.0	2.64	8.9	6.40
"	7.1	2.44	7.8	5.25
"	5.8	4.53	4.0	7.50
"	6.2	5.20	5.8	8.60
"	5.8	2.69	7.8	4.02
"	12.2	3.82	9.2	3.77
"	9.6	2.47	8.5	5.04
"	11.1	2.67	11.0	3.46
"	11.6	2.11	14.0	4.65
"	7.8	3.51	12.0	5.05
"	16.0	2.70	11.6	5.17
"	6.6	2.63	5.8	3.79
"	6.8	2.52	8.0	4.90
"	8.0	2.87	11.2	5.55
"	11.6	2.31	6.6	5.21
"	10.0	1.94	7.8	4.05
"	10.8	2.89	10.6	3.44
"	14.8	3.05	9.4	5.28
"	13.2	3.12	13.0	4.55
"	13.4	2.39	12.4	6.04
"	7.2	1.36	11.4	4.73
"	9.7	2.08	11.2	3.24
"	6.8	2.99	6.5	2.67
"	6.8	1.52	7.9	5.68
"	6.6	3.70	8.6	5.60
"	8.6	2.11	6.9	6.22
"	5.6	4.82	6.8	5.59
"	7.2	2.40	4.9	7.36
"	8.0	3.08	10.8	4.16
"	13.6	3.28	8.6	4.57
T. M. = 2.84			T. M. = 4.87	

* = Controles

** = Inyectadas

72 horas de inoculación

Duración del Exp. minutos	Peso seco membranas mgs.	N*	Peso seco membranas mgs.	Cepa 7**
105	10.4	2.34	16.8	2.42
«	12.2	2.65	14.2	3.62
«	13.4	2.27	20.4	3.53
120	13.6	2.67	13.2	5.14
«	13.6	2.65	12.2	4.76
«	10.0	3.48	15.4	4.71
105			16.2	3.73
«	20.4	2.66	14.2	3.81
«	20.6	3.14	15.0	4.40
«	13.4	2.02	13.0	4.21
120	13.8	3.07	24.2	1.59
«	22.4	2.80	19.6	2.97
«	22.6	1.89	23.6	2.56
«	15.8	1.66		
«	9.6	2.46	13.0	3.44
«	9.4	2.52	16.2	4.34
«	10.6	4.47	12.4	4.70
90	14.6	2.23	12.1	3.34
«	13.6	3.07	10.8	5.26
«	13.0	1.82	13.2	5.02
120	14.0	3.54	16.6	4.05
«	12.8	2.73	14.4	2.90
«	15.4	2.78	17.2	2.20
	T. M. = 2.67		T. M. = 3.76	

* N = controles

** = infectadas

96 horas de inoculación

Duración del Exp. minutos	Peso seco membranas mgs.	N*	Peso seco membranas mgs.	Cepa 7**
90	18.6	3.15	21.4	3.59
«	18.2	3.48	14.6	2.57
«	23.6	2.78	17.8	3.66
120	12.2	3.57	20.0	3.28
«	11.2	2.84	22.2	3.41
«	17.4	2.90	24.8	3.26
«	12.2	3.57	20.0	3.28
«	11.2	2.84	22.2	3.41
«	17.4	2.40	24.8	3.20
105	18.8	1.59	11.8	3.55
«	15.2	1.29	18.2	3.15
«	19.8	2.19	12.0	1.78
«	11.8	2.12	18.8	3.89
«	18.2	1.78	15.2	3.76
«	12.0	2.58	19.8	2.67
120	18.4	4.67	10.4	4.34
«	11.0	3.34	11.0	3.97
«	13.6	4.12	10.9	4.87
	T. M. = 2.84		T. M. = 3.42	

* = Controles

** = Inyectadas

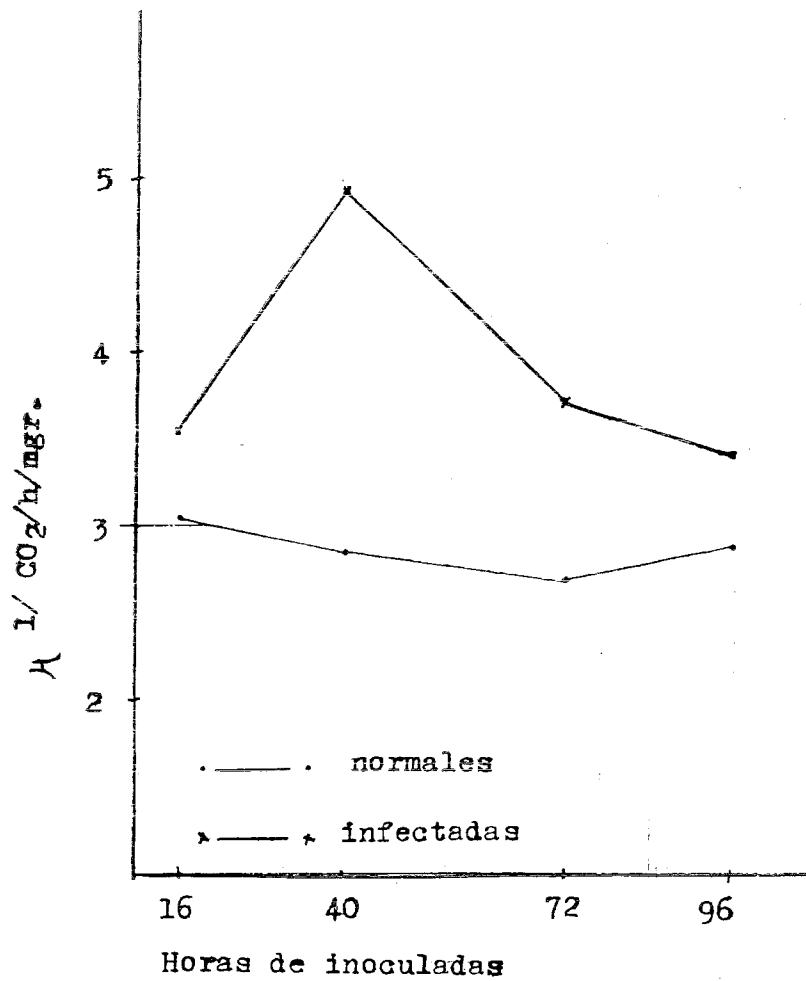


Gráfico 1.

CUADRO N.º 2

PRODUCCIÓN DEL CO₂ /h/PESO SECO DE LAS MEMBRANAS INFECTADAS Y NORMALES EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE GLUCOSA
(40 horas después de la inoculación)

Duración del exp. minutos	N*				Cepa 7**			
	Peso seco membr. mgs.	Sin glucosa C CO ₂ CO ₂	Peso seco membr. mgs.	Con glucosa C CO ₂ CO ₂	Peso seco membr. mgs.	Sin glucosa Q CO ₂ CO ₂	Peso seco membr. mgs.	Con glucosa Q CO ₂ CO ₂
90 ..	6.8	0.84	7.2	1.36	10.6	1.81	11.4	4.73
« ..	8.4	1.50	9.7	2.08	8.2	1.21	11.2	3.24
120 ..	7.0	0.32	6.8	2.99	6.4	0.68	6.5	2.67
« ..	6.4	0.34	6.8	1.52	7.6	1.01	7.9	5.68
« ..	8.0	1.40	6.6	3.70	12.2	0.58	8.6	5.60
« ..	7.0	0.89	8.6	2.16	5.2	0.72	6.9	6.22
105 ..	4.8	1.28	5.6	4.82	8.0	0.85	6.8	5.59
« ..	8.0	0.73	7.2	2.40	7.6	0.86	4.9	7.36
120 ..	7.0	1.69	8.0	3.08	9.4	1.65	10.8	4.16
« ..	15.8	0.95	13.6	3.28	10.7	1.24	8.6	4.57
« ..	7.0	0.53	—	—	6.4	0.50	—	—
« ..	8.6	1.10	—	—	8.8	1.04	—	—
« ..	11.4	1.15	—	—	9.0	0.69	—	—

* = Controies

** = Infectadas

CUADRO N.º 3

TÍTULO DE VIRUS CONTENIDO EN LAS MEMBRANAS CORIOALENTÓDEAS

(En distintos períodos de inoculación)

16 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.
10-4.5	10-5.75	10-5	10-5.25	10-5
10-4.5	>10-5	>10-6	10-5.5	10-5.5
10-4.5	10-5.75	10-5.75	10-5.75	10-5.75
	>10-6			
	>10-6			
	10-5.5			

CUADRO N.º 4

GLICOLISIS ANAEROBIA DE MEMBRANAS INFECTADAS CON VIRUS "A" DE INFLUENZA Y CONTROLES

 $(\mu\text{l}/\text{CO}_2/\text{h}/\text{mgr.})$

Horas después de la inoculación		N.º de experimentos	Peso seco mgr. T.M.	\bar{Q} N_2/CO_2 T.M.	Desviación standard
16	N*	19	10.78	3.13	0.50
	± 7**	18	9.45	3.57	1.17
48	N	44	8.51	2.84	0.83
	± 7	44	8.41	4.87	1.41
72	N	22	14.32	2.67	0.61
	± 7	22	16.63	3.76	1.01
96	N	18	15.60	2.84	0.87
	± 7	18	17.60	3.42	0.60

* N = controles

** 7 = cepa 7 de influenza.

CUADRO N.º 5

PRODUCCIÓN DE CO_2 ($\mu\text{l}/\text{CO}_2/\text{h}/\text{mgr.}$) DE MEMBRANAS CORIOALANTOIDEAS INFECTADAS Y CONTROLES EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE GLUCOSA

(48 horas después de la inoculación)

		N.º de experimentos	Peso seco mgr. T.M.	\bar{Q} N_2/CO_2
Controles	sin glucosa	13	8.30	0.97
	con glucosa	10	8.01	2.73
Cepa 7	sin glucosa	13	8.46	0.98
	con glucosa	10	8.36	4.98

virus ya que de las 16 a 48 horas de inoculadas hay un aumento de cien veces en la cantidad de virus.

Con el método empleado es necesario usar una cantidad considerable de tejidos en el cual probablemente se incluyan células que no han sido infectadas todavía. Sería conveniente efectuar determinaciones en cultivos de tejidos infectados con el virus usando microrespirómetro. En esa forma se evitaría la presencia de células agregadas al tejido que emigran de otras partes del embrión y se tiene una mayor seguridad de la infección del tejido en estudio.

RESULTADOS

1º — Se determinó la glicolisis anaerobia de membranas infectadas con virus A de influenza por medio del aparato de Warburg.

2º — Se encontró que hay un aumento de la glicolisis anaerobia de las membranas infectadas que se hacen significativa a las 40 horas de la inoculación pero que se insinúa a las 16 horas y se atenúa a las 72 y 96 horas de inoculadas.

3º — Se discuten los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. VICTOR J., y HUANG C. H. — J. Exp. Méd., 1944, **79**, 129.
2. RACKER E. y KRINSKY I. — J. Exp. Méd., 1946, **84**, 191.
3. HOWE H. A., y MELLOR R. — J. Exp. Méd., 1945, 81, **81**, 489.
4. PARODI A. S., LAJMANOVICH S., PENNIMPEDE F. C. y MITTELMAN N. — (en prensa).
5. SORDELLI A., TAYLOR R. M., y PARODI A. S. — Revista del Instituto Bacteriológico "Dr. Carlos G. Malbrán", 1941, **10**, 265.
6. REED L. J. y MUENCH H. — Am. J. Hyg., 1938, **27**, 493.
7. VÍVOLI D., PARODI A. S. y PENNIMPEDE F. C. — (en prensa).