

ACCION DEL VIRUS "A" DE INFLUENZA SOBRE LA  
CELULA NORMAL Y TUMORAL CULTIVADA  
"IN VITRO"

Por E. SACERDOTE DE LUSTIG y A. S. PARODI

La célula cultivada "in vitro" ofrece la posibilidad de estudiar en forma directa la relación entre célula y virus en un medio menos complejo que el huevo o el ratón.

Ya en 1937 Francis y Magill (<sup>1</sup>), observaron la multiplicación "in vitro" de un virus recogido directamente del enfermo de influenza y agregado al medio de cultivo.

Nigg Clara, Wilson y Crowley (<sup>2</sup>), en 1941, cultivaron tejido pulmonar de ratones infectados y no encontraron aumento en el título de los primeros y de los últimos repiques. Weller y Enders (<sup>3</sup>) en 1948, estudiaron la aglutinación que produce un virus de influenza de una suspensión de células de membrana amniótica cultivada "in vitro".

En 1950 Murphy, Kazón y Bang (<sup>4</sup>) estudian con el microscopio electrónico las células cultivadas "in vitro" infectadas con el virus PR8 de influenza y observan en las células infectadas filamentos del mismo diámetro de las partículas de virus.

Nosotros nos proponemos estudiar las modificaciones de carácter morfológico que produce el virus sobre células de distinto tipo y analizar así algunos de los efectos observados cuando se lo inocula en el huevo fértil de gallina: detención de desarrollo del embrión (<sup>5</sup>), de la membrana corioalantoidea (<sup>6</sup>), aumento de la glicolisis anaerobia, etc. Al mismo tiempo hemos extendido estos estudios a la célula tumoral cultivada "in vitro", pues experimentos en curso hicieron notar que se producían alteraciones similares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha cultivado músculo de embrión de pollo normal

---

Presentado para publicar el 18 de diciembre de 1951.

y sarcoma proveniente de un tumor a metilcolantreno, un adenocarcinoma de rata de la cepa C<sub>3</sub>H.

El virus utilizado ha sido el virus "A" de Influenza cepa 7 agregado directamente al medio de cultivo en dosis de 1 a 100.000 D. I. M. El control se hacía con líquido corioalantoideo normal.

#### RESULTADOS

*Acción sobre el área de migración del cultivo.* — El virus agregado puro al medio de cultivo detiene por completo el crecimiento.

Cuando el virus es diluido la migración empieza normalmente, pero sigue con dificultad en las horas siguientes debido al gran número de células muertas que impiden un crecimiento normal.

*Acción citológica.* — El primer organoide que sufre por la presencia del virus es el nucleolo el cual pierde su redondez típica y reduce su tamaño.

La cromatina se desplaza hasta que se forma un arco de cromatina en forma concéntrica a la membrana.

Con una concentración mayor de virus se observa la desaparición total de los nucleolos; el núcleo aparece como una masa sólida muy basófila partida en dos.

En las células en división mitótica los cromosomas se aglutinan, no se forma el huso acromático, el proceso de división no llega a su término. (Fig. 1).

El condrioma se fragmenta, el citoplasma aparece arenoso opaco. (Fig. 2-3).

Si la acción del virus es más intensa o más prolongada el citoplasma presenta lobulaciones, (Fig. 4) la membrana celular se rompe hasta que la masa citoplasmática sale al medio nutritivo y la célula estalla. (Fig. 5).

No todos los tejidos tienen la misma sensibilidad; el fibroblasto normal y sarcomatoso sufre más que la célula epitelial.

#### DISCUSIÓN

El virus de influenza, produce dentro de las células alteraciones que se traducen por modificaciones morfológicas o metabólicas.

Las alteraciones que hemos venido observando abarcan contemporáneamente el núcleo y el citoplasma.

La marginación de la cromatina celular también se ha observado en las bacterias infectadas con bacteriofago:

alteraciones seguramente relacionadas con modificaciones del metabolismo del ácido DNA que adquiere una nueva organización espacial para la multiplicación del virus.

Las modificaciones contemporáneas del nucleolo y de las mitocondrias pueden estar relacionadas con el metabolismo del ácido RNA que precede en el tiempo a las modificaciones nucleares. La fragmentación de las mitocondrias, que ocurre cada vez que se presentan modificaciones de la presión osmótica, puede estar además conectada con el metabolismo de los lípidos, constituyente importante del virus de influenza. La presencia de granulaciones esféricas abundantes podrían significar un más alto grado de actividad enzimática.

Como la mayoría de los sistemas enzimáticos respiratorios tienen su localización en las mitocondrias, se puede pensar que el virus precise sus constituyentes enzimáticos para su crecimiento. La mayor superficie mitocondrial no sería otra cosa que la respuesta de la célula infectada a una demanda aumentada de  $O_2$  (aumento de consumo de  $O_2$  que parecería real según algunos experimentos en curso de realización).

En las células en división el virus produce modificaciones que determinan la paralización de la mitosis en la metafase. Si bien se ha observado que las sustancias que inhiben el coágulo plasmático sanguíneo, previenen también el coágulo protoplasmático en general y el mitótico en particular (Helbrunn 1949) (8), esto no se había descrito como acción de los virus y aunque la similitud de las figuras observadas no implica una similitud en los mecanismos, es un hecho a tener en cuenta para su interpretación.

En conclusión, el virus de influenza a causa de su constitución compleja a base de lípidos y de los dos principales ácidos nucleicos actuaría contemporáneamente sobre todos los elementos de la célula que aprovecharía para su autoreproducción.

#### RESUMEN

El virus "A" de Influenza (cepa 7) aislado en una epidemia local, produce lesión de las células en grado variable desde pequeños cambios degenerativos con una dilución de  $10^{-4}$  hasta inhibición de la mitosis, fragmentación del condrioma, piconosis nuclear y nucleolar, ruptura

de la membrana celular con dilución  $10^{-2}$ .

El virus puro inhibe del todo el crecimiento. No se forman inclusiones específicas debidas a la presencia del virus.

No todos los tejidos tienen la misma sensibilidad: el fibroblasto normal y sarcomatoso y el mioblasto sufren más que la célula epitelial.

El virus en los cultivos normales y tumorales afrontados no presenta mayor afinidad selectiva para la célula patológica.

La acción del virus aparece después de la 8ª hora de cultivo y llega a su máximo entre 48-72 horas.

#### S U M M A R Y

Influenza "A" virus (strain 7) isolated in a local epidemic produces in cells cultured "in vitro" an injury of varying degree, from small degerative changes when using of  $10^{-4}$  dilution, to mitosis inhibition, chondrioma fragmentation, nuclear and nucleolar picnosis and rupture of the cell membrane when a  $10^{-2}$  dilution is used.

Pure virus completely inhibits growth of the cultures. No specific inclusions due to the virus are formed.

Not all tissues have the same sensitivity to the virus: the fibroblast, both normal and sarcomatous, and the myoblast suffer more than the epithelial cell.

The action of the virus starts to be noticeable after the 8th hour of culture and reaches its maximun between 48 and 72 hours.

#### BIBLIOGRAFÍA

- 1) FRANCIS, T., MAGIL, T. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1937, 36, 134.
- 2) NIGG CLARA, WILSON D. J., CROWLEY, H. — *Amer. J. Hyg.*, 1941, 34, 138.
- 3) WELLER, T., ENDERS, J. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, 69, 124.
- 4) MURPHY, J. S., KAZÓN, D. T., BANG, F. B. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, 73, 596.

- 5) PARODI, A. S., LAJMANOVICH, S. — *Rev. Inst. Malbrán*, 1945-48, 13, 376.
- 6) PARODI, A. S., LAJMANOVICH, S., PENNIMPEDE F. C., MITTELMAN, N. — *J. Immunol.* 1949, 58.
- 7) SHARPLESS, G. R., DAVIES, M. C., COX, H. R. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, 73, 270.
- 8) MOORE, A. — *Cáncer*, 1941. 2, 516.
- 9) MOORE, A. — *Sheelagh, O'C.*, 1950, 3, 886.
- 10) NEILBRUNN, L. V., WILSON, W. L. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1949, 70 179.

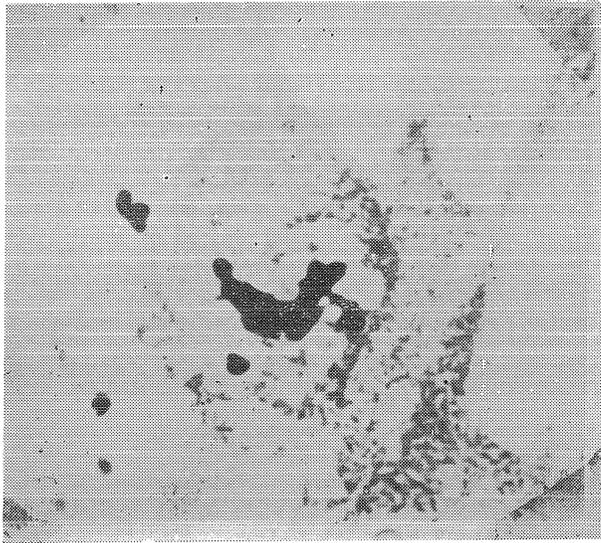


Fig. 1.—Mitosis paralizada bajo la acción del virus  
Cromosomas aglutinados.

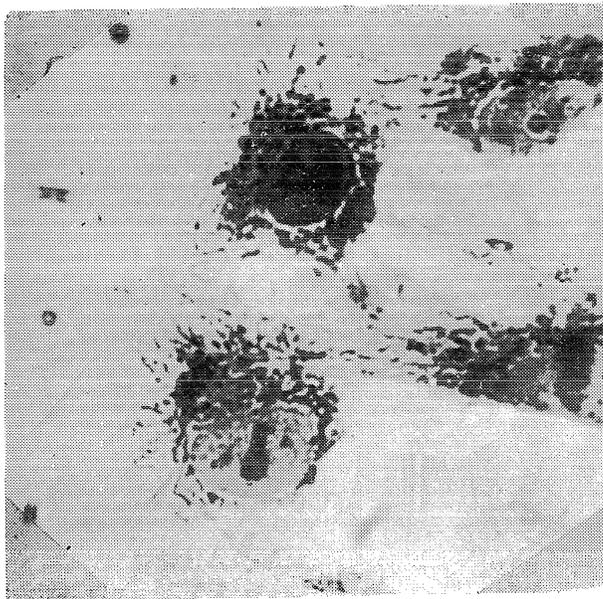


Fig. 2 — Condrioma célula normal Hematoxilina férica.

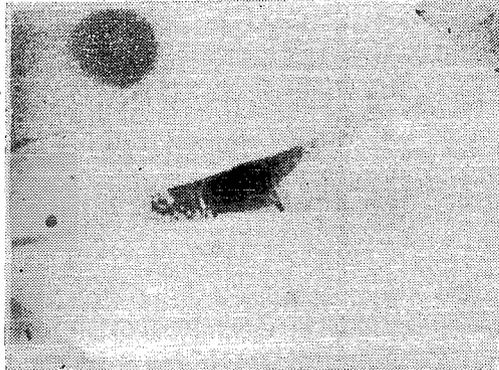


Fig. 3. — Condrioma tratado con virus.  
Aspecto arenoso.

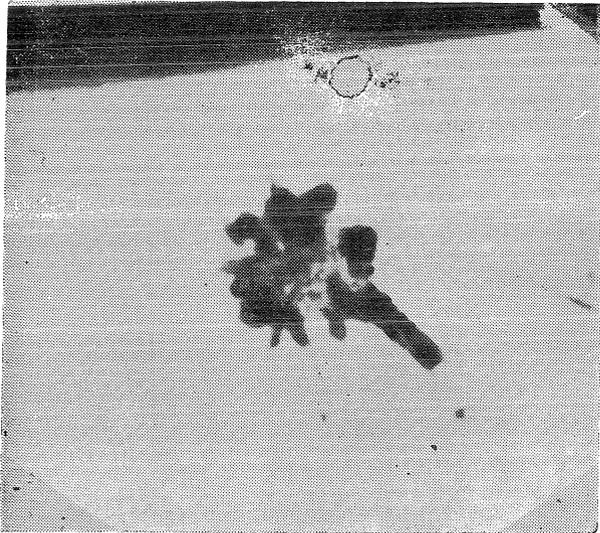


Fig. 4. — Célula cultivada tratada con virus.  
El citoplasma presenta lobulaciones  
de sustancia basófila.



Fig. 5.—Célula de embrión de pollo cultivada tratada con virus. Marginación de la cromatina. Citoplasma estallado.