

1060

CULTIVO DEL M. TUBERCULOSIS EN EMBRIONES DE POLLO

Influencia de la presión atmosférica sobre la virulencia del germen

"Un modesto joven se dirigía, en pleno verano, desde Hamburgo, su ciudad natal, a Davos-Platz, en el cantón de los Grisones. Iba allí a hacer una visita de tres semanas..."

Tal es el principio de la historia de Hans Castorp, "el lindo burguesito de la pequeña mancha húmeda", que vivió siete años en el sanatorio.

Y como su historia, decenas y decenas se sucedieron, aunque nunca fueron contadas: simplemente reposarán en los archivos sus historiales clínicos, reforzando la tradición y la esperanza....

Por muchos años, miles de enfermos han concurrido a los sanatorios para tratamientos de montaña, en Davos, a 1660 m, y en Arosa, a 1890 m. sobre el nivel del mar. La evolución aparentemente favorable de la tuberculosis, con dichos tratamientos, parece depender, según varios trabajos experimentales realizados en el presente siglo, de la influencia de las bajas tensiones de oxígeno existentes en las grandes alturas. Al menos, en este sentido hacen pensar las observaciones "in vitro" sobre el comportamiento del bacilo bajo condiciones de oxígeno restringido. Tiene todavía que hacerse la comprobación experimental "in vivo", a pesar de que muchos trabajos con animales de laboratorio, son ya bastante definidos y concluyentes. En 1939, en una conferencia de la "Asociación Clínica" de Rotterdam, se ha

hablado de la posibilidad de beneficiar a los enfermos tuberculosos en tratamiento, manteniéndoles en locales con baja concentración de oxígeno (1).

En el presente trabajo, se trata de aprovechar de un medio muy valioso de investigación, el embrión de pollo, para conocer algo sobre el comportamiento del bacilo tuberculoso, bajo las condiciones especiales de que podemos disponer en nuestro ambiente. Es decir utilizando este huésped capaz de reaccionar dando respuestas uniformes dentro de condiciones uniformes, se trata de establecer las diferencias que pueden existir en la histopatología de la enfermedad experimental, en dos diferentes altitudes: Guayaquil y Quito.

CAPITULO I

INTRODUCCION.—SOBRE LA FISIOLOGIA DEL MYCO. TUBERCULOSIS HOMINIS

1—Constitución Química.

Estas células bacterianas tienen una constitucion similar en general, a las células de cualquier otro organismo vivo, con ciertas características que las acercan más a los hongos. La composición química exacta es difícil de establecer, particularmente debido a que varía con la composición del medio en que se desarrolla; por lo mismo, no puede sorprender que el conocimiento que se tiene sobre el asunto, sea harto fragmentario e incompleto. Este conocimiento se ha realizado a partir del estudio de masas multiformes de cultivos, debido al sinnúmero de factores de orden técnico que no pueden ser repetidos con exactitud de un investigador a otro. Naturalmente, la diferencia de constitución química entre dos cultivos e incluso dos cepas de una misma especie, es mucho menor que la diferencia entre dos especies o dos géneros: de aquí la posibilidad de establecer los grupos taxonómicos.

Se admite que el bacilo tuberculoso está constituí-

do por 85% de agua, sustancias minerales, en parte en combinaciones orgánicas, y sustancias orgánicas. De su peso en seco, + 9% es nitrógeno, 51% carbono. Da lugar a 8 o 9% de cenizas (2, 3, 4).

a—Sustancias minerales, varían cuantitativamente con la composición del medio de cultivo. La mayor parte de cenizas está constituida por ácido fosfórico (P2O5), del que se encuentra de 43 a 47% (en la mayoría de especies bacterianas, 10—45%). Entre los constituyentes minerales se han identificado sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, silicio, iones SO₃ y Cl. En combinaciones orgánicas, el fósforo interviene en la constitución de ácidos nucleicos, fosfolípidos y nucleoproteínas; el magnesio está en combinación con el ácido ribonucleico, que parece ser el responsable de la Gram positividad bacteriana (") (2, 4).

b—Polisacáridos. Del Myco. tuberculosis se han aislado complejos polisacáridos, unos desprovistos de nitrógeno y fósforo que liberan glucosa en hidrólisis, y otros que los contienen y dan lugar a azúcares, aminoazúcares y ácidos orgánicos de cadena corta (2, 4). Una considerable cantidad de carbohidratos está en combinación con lípidos.

c—De los Lípidos, en una proporción variables están firmemente ligados en los complejos celulares y son difícilmente extraídos por los solventes neutros. Por extracción fraccionada con alcohol-éter y luego cloroformo y acetona, se ha logrado separar el material lipoideo en tres fracciones: glicéridos, fosfátidos y ceras cloroformosolubles. El extracto alcohol-etéreo contiene todavía una considerable cantidad de polisacáridos. De las células totalmente desgrasadas por los solventes neutros, es posible separar un 15% más de lípidos, empleando una mezcla acidificada de alcohol y éter. En total el contenido de lípidos del Myco. tuberculosis humano es 40%

(")—En rigor no se puede decir que el bacilo tuberculoso es Gram positivo porque una vez coloreado con los colorantes básicos, no se decolora con alcohol se haya o no tratado con yodina (5).

de la materia orgánica; estos lípidos son ácidos grasos libres grasas neutras, ceras y fosfolípidos que dan por hidrólisis manosa e inositol.

Es interesante anotar que el contenido total de lípidos en el tipo humano del Myco. es mayor que en los saprófitos ácido-resistentes, y al revés, el contenido total de polisacáridos es mayor en los saprófitos que en el de tipo humano (4).

Los ácidos grasos libres forman el bulto del total de lípidos. Junto a los más comunes (palmítico, esteárico, oleico, láurico, mirístico, tetracosánico, cerótico, linoleico, butírico, caproico) se encuentran dos ácidos de carácter específico: el ácido tubérculosteárico y el ácido ftioico, el primero ópticamente inactivo e isómero del ácido estearico y el segundo ópticamente activo, isómero del ácido cerótico (2, 4).

Las grasas neutras son ésteres de los ácidos grasos de más alto peso molecular. No hay ésteres con el glicerol.

Las ceras dan lugar por saponificación a pequeñas cantidades de ácidos grasos bajos. Cuando purificadas, las ceras se separan en dos fracciones: la una "cera blanda", es un complejo glicérido; la otra, "cera pura", libera por hidrólisis un 56% de cera insaponificable que corresponde a los altos alcoholes de los primeros autores o a los hidroximetoxi-ácidos, que tienen la propiedad de ácido-resistencia, (ácido micólico entre ellos). (").

Esta segunda fracción contiene también polisacáridos que liberan por hidrólisis, manosa, d-arabinosa, galactosa.

Los fosfátidos del bacilo tuberculoso contienen más o menos 3% de fósforo y 1% de nitrógeno (la lecitina contiene 4 y 1.8% respectivamente).

Esta constitución particular del bacilo le confiere ciertas propiedades típicas. Así, el Myco. tuberculosis, es difícilmente coloreable y una vez teñido, difícilmente

(")—El llamado "cord factor", principio tóxico del bacilo virulento, está íntimamente relacionado con este ácido.

decolorable. Esta propiedad ácido-resistencia, se atribuye a la alta concentración de lípidos que es también responsable del carácter hidrofóbico de la superficie celular, que ocasiona el crecimiento superficial y en grumos en los medios líquidos, y finalmente, da lugar a tipos especiales característicos de reacción en el tejido huésped. Esta sola característica estructural es también responsable del comportamiento frente a los medios antibacterianos, diferente del de bacterias no ácido-resistentes, y de la especial resistencia del bacilo frente a ácidos y álcalis fuertes que se utilizan en la práctica para tratar materiales patológicos contaminados (").

d—Los Prótidos, en el bacilo tuberculoso se han denominado genéricamente tubérculo-proteínas. Se reconocen diferencias entre las del bacilo de tipo humano y las de bacilos bovino, aviar o saprófito. Las tubérculo-proteínas son hidrosolubles. Se han aislado dos o tres tipos de ellas, de las cuales por lo menos una es el principio activo de la tuberculina; estas proteínas son muy complejas y tienen diferente constitución química y características inmunológicas entre sí.

Se han separado por lo menos tres diferentes componentes antigénicos de las proteínas del bacilo huma-

(")—Poseen ácido-resistencia la volutina, ciertas inclusiones lipoideas del género *Bacillus*, endósporos y algunas especies de *Actinomyces*. La elección del agente diferenciador depende del grado de ácido-resistencia: para el bacilo tuberculoso, se puede emplear ácidos minerales fuertes. Según Lamanna (6), la resistencia reside en la mayor solubilidad del fenol y del colorante en los constituyentes celulares, que en el agente decolorante. Se atribuye esta propiedad al material lipoideo que contiene en su interior; es más pronunciada en la membrana citoplasmática y en los gránulos internos celulares. La antigua creencia de que existe una cápsula cerosa al rededor de la célula se ha demostrado falsa desde los trabajos de Knaysi en 1.929 (7). Se han aislado grasas neutras, ceras y ácidos grasos ácido-resistentes. A partir de la "cera insaponificable", se ha aislado el ácido micólico, fuertemente ácido-resistente (4). No se conoce la relación exacta entre el colorante y el sustrato, pero es fundamental la integridad celular para que se mantenga esta propiedad (8). De todos modos se puede decir que el sustrato ácido-resistente es un producto metabólico y se puede evitar su acumulación empleando medios de cultivo apropiados, sin pérdida de virulencia y Gram +. En el tejido animal los bacilos pueden perder la ácido-resistencia quedando Gram +, (2, 7).

no. Entre las fracciones, la llamada PPD-b3 (Purified Protein Derivative), parece responsable de la reacción tuberculínica y tiene un peso molecular 16.000, con 4.4% de sacáridos y 3% de ácido nucleico. Ruppel en 1.898 comunicó 23% de nucleoproteínas en el bacilo de Koch (9).

e—Entre los Productos Metabólicos, el bacilo tuberculoso produce en los medios de cultivo, catalasa y H₂S. Entre los productos sintetizados se encuentran el pigmento ftiocol que posee una actividad semejante a la de la vitamina K, y un alcohol de alto peso molecular, el tiocerol. La cepa humana H37 y la bovina Ravenel sintetizan todas las vitaminas del grupo B, incluso el ácido fólico y la biotina, pero estas vitaminas añadidas a los medios de cultivo, no influyen en su desarrollo (2, 3).

2.—El problema de la respiración del bacilo tuberculoso.

a—Comportamiento Aerobio.—Las bacterias forman su protoplasma a partir de sustancias de bajo contenido de energía, sintetizando todos los compuestos orgánicos como carbohidratos, lípidos y prótidos, que son ricos en energía. Para realizar esta síntesis, derivan a su vez la energía necesaria por medio de la respiración (bacterias aerobias) o de la fermentación (bacterias anaerobias).

Los textos establecen insistentemente que el bacilo de la tuberculosis es aerobio estricto, no pudiendo desarrollarse en ausencia total de oxígeno libre. Sin embargo, se ha objetado este punto de vista, al observar el crecimiento de colonias profundas en medio sólido y de colonias subsuperficiales en medio líquido, que podrían considerarse en parcial anaerobiosis. Estas observaciones tienen diferente interpretación, frente a la idea moderna de considerar a las bacterias, aerobias, no sólo por su capacidad de utilizar el oxígeno del aire ambiente, sino también por contener sistemas respiratorios enzimáti-

cos (citocromos, catalasa), que las capacite para una completa degradación oxidativa de carbohidratos hasta CO₂ y agua. El conocimiento de la respiración del bacilo es incompleto, pero sabemos que es capaz de llevar a cabo oxidaciones completas y así, Merrill (10) y Uga (11) han establecido que los productos finales de la desintegración de carbohidratos por el bacilo, son casi exclusivamente CO₂ y agua. Buc (12,13) en sus estudios refiere crecimiento "aerobio" y "anaerobio" en medios sólidos, pero si bien el observó ciertas diferencias entre los bacilos sumergidos y de superficie, sus datos no pueden considerarse definitivos, porque no hizo determinaciones de la tensión de aire en el terreno. Desde Rahn and Richardson (14) se conoce que tanto terrenos sólidos como líquidos contienen proporciones favorables de aire (O₂) disuelto, proveniente del medio ambiente, aunque en realidad, la cantidad que se difunde sea insuficiente para mantener un cultivo por mucho tiempo. Estos AA., utilizando azul de metileno como indicador determinaron la velocidad de difusión del aire en el medio de cultivo, llegando a la conclusión de que medios que contienen carbohidratos sobre todo, que favorecen la absorción, soportan cultivos con hasta 10¹ y 10⁸ bacterias por cc., antes de quedar exhaustos de O₂.

Boecker en 1.923 (15) concluyó que el alto contenido de fósforo orgánico (ATP, ADP) en el bacilo, favorece la utilización del oxígeno combinado; pero también este autor utilizó siembras abundantes y agitación del medio, que debía aumentar la cantidad de aire disuelto, y no hizo comprobaciones con bajas tensiones del mismo.

Cohn (16) estableció que el bacilo es aerobio estricto, aunque las necesidades de oxígeno libre pueden ser muy pequeñas. En un buen terreno, cantidades mínimas de O₂ que pueden penetrar con el nitrógeno al llenar los tubos previamente llevados al vacío, son suficientes para soportar un crecimiento visible de inóculos muy pequeños (0.00001 mg. por tubo). Cohn llegó a la conclusión de que el bacilo es primordialmente aerobio y prolifera mejor cuando hay una provisión abundante de

aire. También para Rahn y Richardson, condiciones óptimas de provisión de O_2 , son más favorables para su metabolismo. Según estos AA, el bacilo requiere 1.22% de O_2 para oxidar 1% de glicerol en el medio; en los medios ordinarios y en tubos o frascos pequeños, la provisión es insuficiente: si se distribuye 220 cc. de terreno dejando gran superficie (en frasco de 1 litro), se debería renovar unas 14 veces el aire ambiente, para proveer del oxígeno necesario para oxidar todo el glicerol (14)

Hay una opinión prevalente en contra de la ocurrencia de fermentaciones en el bacilo (17). Los Q.R. (cuociente respiratorio) $= C_{O_2}/O_2$ para varios terrenos han sido calculados por Novy y Soule en 1.925, determinando con precisión la producción de CO_2 y el consumo de O_2 : En agar glicerinado Q.R. $= 0.836$; en agar glucosado Q.R. $= 0.992$; en aga rsuero Q.R. $= 0.904$. Valores que varían poco de los anteriores hallaron los mismos autores en 1.927 (18,19). Pero estos valores no dan una idea completa del sinnúmero de procesos que envuelve el desarrollo del bacilo, de allí que, para Edson (17) esta incertidumbre desaparecería sólo haciendo determinaciones del Q.R. en diferentes fases metabólicas: al principio durante 6 o 7 días de desarrollo bacteriano, la síntesis de los lípidos, sustancias pobres en oxígeno y que hacen más de 30% del peso total de los organismos, a partir de glucosa y glicerol (sustancias ricas en oxígeno), es el proceso metabólico predominante, y el Q.R. es superior a la unidad; posteriormente, la respiración continúa en la fase llamada estacionaria, ya no hay síntesis, el Q.R. por lo mismo, baja del valor de la unidad. Y, efectivamente, según trabajos previos (20), el Q. R. es igual a 1.75 durante la fase síntesis, de desarrollo, que coincide con la mayor utilización de glucosa del terreno, para bajar a 0.75 durante la fase estacionaria.

Heplar (21), trabajando con la cepa H37Rv encontró los siguientes valores para el Q.R.: 0.91 endógeno, 0.97 en lactato y 0.74 en Dubos Medium. Estos valores varían, elevándose de 7 a 15% bajo condiciones de oxígeno restringido (atmósfera con 1% de O_2), elevación

que para Heplar, sugiere que puede ocurrir al menos un pasajero metabolismo fermentativo endógeno. Luria determinó que el consumo de O_2 en terreno de Dubos con Tween 80 es superior al consumo en el mismo terreno sin Tween 80, permaneciendo invariable sin embargo, la curva de velocidad de multiplicación en la fase de crecimiento logarítmico (22).

Novy y Soule (18) y Kempner (23) no admiten cambios en el Q.R. a baja tensión de oxígeno, pero la comunicación de Heplar (21) es muy aceptable y concluyente y, por otro lado, sus conclusiones concuerdan en parte con las observaciones de Loebel y col. (24) con bacilos expuestos a anaerobiosis: la respiración endógena y la viabilidad, no son afectadas durante las 24 primeras horas. Con mayor tiempo de exposición a anaerobiosis, el proceso aparece suspendido, la respiración endógena abolida, y la viabilidad desaparece después del tercero o cuarto día. Los saprófitos parecen más resistentes a la anaerobiosis: *M. phlei* soportó al menos 35 días a la exposición.

De todas maneras el problema no está definitivamente resuelto y debemos admitir, bajo la definición dada de bacterias aerobias, que el bacilo tuberculoso se comporta como tal, siendo particularmente sensible a la presencia del oxígeno libre. Es también de mucha significación que, bajo las mismas condiciones la oxidación aerobia de glucosa da lugar a 686.000 cal. mientras en anaerobiosis, la fermentación hasta ácido láctico libera solamente 54.000 cal. Es decir, la fermentación es un proceso ineficiente, comparado con la respiración (5). Según Loebel y col. (25) el bacilo tuberculoso, por descomposición anaeróbica de la glucosa toma una energía menor que $1/200$ de la energía obtenida por oxidación

b. Influencia de las tensiones relativas de CO_2 .—

Los primeros datos en relación con la cantidad de CO_2 favorable al crecimiento del bacilo, son muy variados (26). La cantidad óptima indicada por Novy y Soule (18) es de 30%; para Corper y col. (27) 14.5%; para Ebina (28) de 5% y para Davis (29), de 2.5%. Hay pues mucha discrepancia entre los datos de varios auto-

res y para fines prácticos puede considerarse favorable una tensión de hasta 14%, para obtener condiciones de crecimiento. La cantidad que comienza a inhibir el crecimiento ha sido determinada sobre 60% por Novy y Soule (18).

c. Influencia de las tensiones relativas de O₂.—

Las cantidades óptimas de O₂ para el crecimiento del *Myco. tuberculosis hominis*, van de 20 a 50% (18, 11, 28, 30). Una atmósfera de oxígeno puro es más bien desfavorable para el crecimiento, tanto para la cepa humana como para la bovina y la aviar. Potter en 1942 demostró que trazas de oxígeno libre en humedad y a 38° C. matan a estos bacilos después de una exposición de 25 a 30 días (31).

Kempner (23) estudió las necesidades de O₂ de cultivos de la cepa H37 y encontró que su desarrollo depende grandemente de las variaciones de su concentración, especialmente dentro de los límites que ocurren en el organismo humano. Incluso una reducción moderada en la tensión de oxígeno, daría lugar a una disminución apreciable en el metabolismo de los bacilos. Este A. ha examinado la respiración del bacilo tuberculoso como una función de la concentración del O₂ del aire, encontrando una curva similar a la conocida curva de la disociación de la oxihemoglobina; la respiración alcanza su máximo a una concentración de 12-14% inhibiéndose la velocidad normal de la utilización del oxígeno a tensiones de 14% de O₂. El cociente respiratorio permanece prácticamente constante, y vale 0.75.

Según Corper y col. (27), el bacilo crece mucho mejor en el aire ordinario con 21% de O₂, que en una mezcla gaseosa de igual composición que la del aire alveolar que es de 15.9% y 6.4% de CO₂ (a 628 mm.Hg.) El crecimiento es aún menor en una mezcla gaseosa con la misma constitución que el contenido gaseoso de la sangre venosa: 5.6% O₂ y 7.5% de CO₂, y, aunque las bacterias no mueren, no hay crecimiento alguno con la concentración de 0.1% de oxígeno.

Kempner calculó que la velocidad de utilización de O₂ por el bacilo en los pulmones a nivel del mar, estaría inhibida en un 20% en relación con cultivos en atmósfera normal a nivel del mar. Es decir, la diferencia de tensión de O₂ entre el aire alveolar, 14% O₂ y el aire ambiental, 21% O₂, es suficiente para ocasionar una inhibición del metabolismo. A 3.000 m. de altura, dicha inhibición llegaría a ser de 33 a 58%.

Los datos en relación con la cantidad de O₂ tomado del medio son muy variados. Mientras unos AA. dicen que 1 mg. de bacilos (peso en seco) consume 2 milímetros cúbicos (32), o 20 mm. c. (33) por hora, otros autores indican que dicho consumo se eleva hasta 1.8 cm. cúbicos (11). Lo que si se ha demostrado es que con un aumento de tensiones del O₂ ambiental, el consumo por el bacilo puede elevarse hasta un 100%, lo cual significa desde luego, un incremento del metabolismo.

3. Condiciones metabólicas del bacilo en los tejidos.—

Se repite frecuentemente en la literatura un hecho fácilmente observable: en las lesiones tuberculosas activas, se encuentran muy pocos bacilos. Si la lesión es caseosa, los gérmenes se encuentran en buen número en la periferia, son muy escasos en el centro, tanto más si la lesión es muy antigua y cerrada (34, 35, 36, 37, 38, 39). Aún más, no sólo que el número de bacilos es menor en lesiones caseosas, sino que estos bacilos no son viables en la mayor parte de casos, y dan lugar a inoculaciones y subcultivos negativos, sin embargo de que mantienen la morfología y propiedades tintoriales conocidas (38, 39.)

Puesto que el bacilo tuberculoso depende grandemente de su metabolismo aerobio para su supervivencia y multiplicación, es obvio pensar primeramente en que la progresiva esterilización de las lesiones se debe al deficiente intercambio gaseoso de ellas: mínima afluencia sanguínea, pequeñísima difusión de O₂ hasta el centro necrótico. El restringido intercambio sanguíneo no sólo daría lugar a déficit de oxígeno disponible por el bacilo,

sino también a acumulación de sustancias del metabolismo (CO₂, ácido láctico, ácidos grasos, etc.), (35).

Existen varias observaciones experimentales "in vivo", de acuerdo con este postulado: se citan las observaciones de Volwald (40) según las cuales el feto de cobayo es marcadamente resistente a la infección, coincidiendo esto con el bajo contenido de oxígeno de la sangre fetal. Se conoce también que el cobayo (41, 42) y el ratón (1) son menos sensibles a la infección si se les somete a tensiones reducidas de oxígeno, lo cual, según los trabajos de Campbell (43) llevaría a menor tensión de O₂ en los tejidos del animal. En los experimentos de Ong y col. (1.947) la supervivencia fué mayor y las lesiones menos extendidas y graves, en los ratones tratados con atmósfera de 9-13% de O₂, que en los de control. Para Ong, la progresión de las lesiones en los tejidos depende de la cantidad de O₂ que estos dejan disponible al bacilo: mientras mayor es la cantidad de oxígeno que consume el órgano, menor es la cantidad de que dispone el bacilo. El corazón seguramente es el órgano que más O₂ consume, 4.3 a 8.5 cc. por 100 gramos y por minuto, y también es el órgano menos sensible a la infección tuberculosa; el pulmón, que consume solamente 1.5cc. de O₂ por minuto por 100 gms. es precisamente el órgano más sensible (1).

Por fin, se sabe perfectamente que la infección no progresa en pulmón colapsado (aplicación terapéutica).

Pero, no obstante existir varias observaciones experimentales sobre el carácter nocivo de las bajas tensiones de oxígeno, Dubos cree que este fenómeno —menor aireación de los centros necróticos— por sí solo no es suficiente para volver no viables a los bacilos incluídos en ellos (35).

Sus trabajos con cultivos de bacilos in vitro, le llevaron a la conclusión de que muchas de las sustancias que se encuentran normalmente en las lesiones necróticas (ácidos grasos de larga y corta cadena, otros ácidos alifáticos), tienen un marcado poder inhibitorio de los cultivos, efecto posiblemente indirecto en muchos casos, porque muchos de estos ácidos favorecen la utilización

del oxígeno por el bacilo. La causa primaria de estos efectos, podría ser el que casi todos estos compuestos, ácidos grasos, tienen propiedades tenso-activas que pueden ocasionar lesionese de las membranas bacilares. En segundo lugar, un aumento del metabolismo no seguido por multiplicación del bacilo, daría lugar a un agotamiento de materiales de reserva y naturalmente a interferencia en su proliferación, por acumulo de sustancias tóxicas. Todas estas sustancias se producen normalmente por metabolismo tisular y por cambios autolíticos consecutivos a inflamación y necrosis y algunas de ellas se encuentran 'in vivo' en las cantidades capaces de inhibir el crecimiento del bacilo 'in vitro' en presencia de suero bovino. Estas sustancias ejercerían un efecto bacteriostático, antes que bactericida.

La presencia de ácidos orgánicos, metabólicos o desecho tisular, que da lugar a acidificación en las lesiones inflamatorias y necróticas, constituye uno de los muchos factores que pueden intervenir para dificultar el progresivo desarrollo del bacilo en las lesiones. Pero la suerte del bacilo parece depender también de otros factores, sin tomar en cuenta la actividad realmente inmunitaria celular, ni la propiedad de los leucocitos y mononucleares de fagocitar los bacilos. Se conoce ahora ciertos extractos de tejidos animales, que son capaces de retardar e inclusive inhibir el crecimiento del bacilo 'in vitro'.

Hirsch y Dubos (36) han aislado de estos extractos (alcohólicos) una sustancia cristalizable con poder inhibitorio, la espermina, una amina básica, que ha sido reconocida ya anteriormente en muchos órganos animales, especialmente en próstata y páncreas. En casos de neumonía, tuberculosis y cáncer, el tejido enfermo contiene más espermina que el tejido sano del mismo órgano. La acción de la espermina es bactericida y se manifiesta "in vitro" en presencia de una fracción de sero-albúmina bovina. "In vivo", probablemente proveen el medio necesario los mismos tejidos. Ha sido encontrada también en extractos de ganglios linfáticos tuberculosos, una sustancia capaz de inhibir el desarrollo del bacilo

y de impedir la tuberculosis generalizada en cobayos inoculados con cultivos virulentos (44). Esta sustancia no ha sido aislada, y no se conoce la relación que pueda tener con la espermina, pero los extractos de ganglios linfáticos sanos, no tienen acción inhibitoria.

4. Virulencia y patogenicidad.

a Sus relaciones específicas.—Es muy verosímil la hipótesis de Rich, según la cual las especies patógenas de *Mycobacterium* se originaron de antiguas especies saprófitas libres en la naturaleza, por adaptación a los organismos animales (34). La adaptación ha dado como consecuencia una serie de modificaciones metabólicas que hacen que el microorganismo pueda proliferar solamente bajo las condiciones provistas por su huésped específico, al cual ocasiona a su vez una serie de alteraciones.

La especie tipo del género consta de una serie de variedades adaptadas a animales de sangre caliente y a animales poikiloterms. Las más conocidas son *M. tuberculosis hominis*, *M.tbc. bovis* y *M.tbc. avium*, que producen enfermedad espontáneamente en el hombre, en los bovinos y en las aves, respectivamente. Puede darse el caso de infecciones heterólogas, pero la frecuencia mayor se encuentra en la especie "nativamente sensible" a una variedad.

Bacilo tipo aviar. Se encuentra muy diseminado entre las aves y puede también localizarse en varios animales más o menos sensibles en los cuales produce lesiones muy limitadas; la infección espontánea en los mamíferos es muy rara, y el cobayo es altamente resistente.

La infección en las aves, fundamentalmente digestiva, se caracteriza por ulceración intestinal, formación de tubérculos en las vísceras, hígado y bazo especialmente, con presencia de células gigantes y células epitelioideas y frecuentemente necrosis, aunque el reblandecimiento de tipo caseoso es menos frecuente en los

mamíferos. El número de bacilos presentes en las lesiones intra o extracelulares, es sumamente grande.

Las aves tuberculosas reaccionan a la tuberculina del bacilo aviar, pero son necesarias dosis muy altas para que la respuesta sea típica.

De las gallinas enfermas, menos del 1% ponen huevos infectados, así que existe la posibilidad de infecciones humanas de este origen. Pero después de la comprobación de Rich (34), parece que el bacilo aviar no es patógeno para el hombre: existen pocas comunicaciones de varios autores, pero son muy discutibles y además, sin demostraciones muy claras.

Bacilo tipo bovino. Produce tuberculosis principalmente en el ganado bovino y eventualmente puede parasitar a los animales domésticos; las aves son altamente resistentes. El hombre es susceptible. El conejo es sumamente sensible.

En el ganado, las lesiones producidas no son diferentes de las lesiones humanas, aunque varía un poco la frecuencia de infección particular a cada órgano. En orden de importancia, hay localizaciones intestinales, en los ganglios linfáticos, en los pulmones, en el hígado, bazo y cavidades serosas y en general en todos los órganos del animal infectado. La contaminación de la leche por infección en las ubres es muy frecuente.

La infección en el hombre adquiere gran importancia por su extensión, sobre todo en algunas regiones de Europa meridional. Es más frecuente en los niños y de localización entérica y ganglionar. En los EE. UU. corresponde al 11.1% de las tuberculosis generalizadas (34). Entre nosotros Cartagena comunica, en un trabajo en que métodos e interpretaciones son muy objetables, 3.75% de infecciones pulmonares debidas al tipo bovino del bacilo tuberculoso (45).

La infección en el hombre rara vez es de localización pulmonar y sistemática, es más bien de los órganos abdominales y de la piel.

Bacilo tipo humano. Produce la gran mayoría de tu-

berculosis generalizadas en el hombre (88.9% EE. UU.) (96.25% en Quito). Las tuberculosis pulmonar y bronquial son más del 99%.

Entre los animales más susceptibles se encuentran los monos, ratones y cobayos: El hombre posee mayor resistencia natural que el cobayo. Son resistentes: toros, cabras, ovejas, conejos y una gran mayoría de pájaros (excepto loros y canarios).

En el organismo humano no hay órgano inmunes, y las diferentes frecuencias de localización particular se deben a diversas condiciones: exposición directa a la entrada del bacilo al organismo, factores mecánicos de diseminación por la corriente sanguínea, "capacidad" del órgano o tejido para soportar el crecimiento del bacilo que se localiza en él, etc.

En la tuberculosis miliar generalizada en que se encuentran lesiones en prácticamente todos los tejidos, el asiento más frecuente de lesiones progresivas son los pulmones, ganglios, intestinos, cavidades serosas, huesos y articulaciones, aparato urogenital, piel, sistema nervioso central y ojos, sucesivamente en orden de frecuencia. El hígado y el bazo que se consideran como órganos muy frecuentemente lesionados, son raramente involucrados en lesiones progresivas en el hombre.

En la mayoría de los casos la infección se transmite de personas a persona, por contacto directo, o por contacto con materiales infectados (sobre todo si no han sido expuestos a la luz solar), o a través de una tercera persona que porta el material infectado. (Los alimentos contaminados por moscas felizmente no son muy peligrosos, porque el número de bacilos que acarrean es pequeño y la infección por el tracto digestivo es escasa, pues los bacilos no multiplican en los alimentos por sus exigencias culturales).

La posibilidad de infecciones de tipo cruzado, las llamadas localizaciones heterólogas, hace que en el laboratorio se recurra a diversos procedimientos **para diferenciar** las cepas aisladas de materiales patológicos. La diferenciación no es fácil, si se recurre solamente a caracteres morfológicos y a reacciones inmunológicas. Va

rios autores han intentado tipificar las cepas recurriendo a reacciones de precipitación entre sueros inmunes y diferentes fracciones de tuberculoproteínas o tubérculo-sacaridos, pero tanto por los resultados poco consistentes como por las graves dificultades técnicas que presentan, no se pueden utilizar en la práctica. Se recurre más bien a los caracteres culturales (colonias eugónicas y disgónicas), caracteres morfológicos difícilmente diferenciables y a la patogenicidad para diferentes especies animales. (v. tabla I).

TABLA I

Poder patógeno de los bacilos tuberculosos para animales de laboratorio

Animal	Bac. hominis	Bac. bovis	Bac. avium
Cobayo	++++	+++	0
Conejo	+	++++	++++
Ternero	+	++++	++
Aves de corral	0	0	++++
Ratón ("")	+	++++	++
Monos y antropoides ..	++++	+++	0

El conejo se emplea para diferenciar los tipos humano y bovino. El bacilo tipo humano produce lesiones estrictamente localizadas, mientras el tipo bovino las produce generalizadas, dando lugar incluso a la muerte del animal.

El cuadro dado anteriormente presenta la distribución de esta especie bacteriana entre diferentes especies animales, pero no da idea de los mecanismos fisiológicos que capacitan a los bacilos para causar enfermedad en el huésped.

b) Sus relaciones con constituyentes químicos del bacilo.—Hay una tendencia general a relacionar la **virulencia** de las especies **patógenas** con una particular

("")—Ciertas cepas de ratones son altamente susceptibles a los tipos humano y bovino, y otras son muy resistentes (46).

estructura química del cuerpo bacteriano, puesto que hasta ahora no se ha logrado determinar claramente la presencia de exo-ó endotoxinas en el bacilo tuberculoso.

Acción de las tubérculo-proteínas. Ya sean aisladas del cuerpo bacteriano o extraídas del medio de cultivo, no ejercen efecto tóxico apreciable en el organismo animal normal. Se habla de alzas térmicas, pero no parecen reacción específica. La dosis tóxica experimental, correspondería a cantidades enormes de bacilos. En cultivo de tejidos, las células permanecen indemnes añadiendo tubérculoproteínas, pero mueren si dichas células provienen de animal tuberculoso (hipersensible). El animal tuberculoso tiene hipersensibilidad a la tubérculoproteína, que provoca fiebre, necrosis local y síntomas constitucionales. En el animal sano, la administración de tubérculoproteína puede establecer sensibilidad anafiláctica tipo Arthus, pero no "tipo bacteriano" propiamente dicho, porque seguramente pierde la proteína alguna ligazón importante que tenía en el bacilo, o es en efecto, insuficiente (34).

La tubérculo-proteína en los tejidos produce la misma inflamación de carácter microscópico que produce cualquier otra proteína; es decir, afluencia de mononucleares, sin aparición de los elementos del tubérculo. Al inyectar a un animal tuberculoso, se produce el tipo considerado específico de respuesta en el sitio de la inyección, pero en realidad parece que corresponde más bien a una reacción a un cuerpo extraño, en animal hipersensible. La causa sería la necrosis del tejido adiposo superficial, que ocurre en la reacción tuberculínica pero que se presenta también en otros casos, como las lesiones traumáticas.

De todos modos, las tubérculoproteínas, producen la hipersensibilidad, o mejor, son las responsables del establecimiento de hipersensibilidad en animales enfermos (anteriormente se ha visto que algunas fracciones de proteínas tienen carácter antigénico, etc.) (3, 4, 5, 34).

Acción de los tubérculo-carbohidratos. No son tóxicos, no ocasionan formación de tejido tuberculoide, ni provocan hipersensibilidad, ni reacciones locales de tipo

tuberculínico en organismos sanos ni en hipersensibles. Parece que el animal tuberculoso puede dar un tipo de reacción anafilática a ciertos carbohidratos, pues sueros de animales inmunizados con tuberculosis contienen precipitinas anti-carbohidratos. Tienen seguramente cierta significación inmunológica, aunque no tienen que ver con la patogenicidad, puesto que se encuentra también en otros organismos ácido-resistentes (34).

No son verdaderos antígenos puesto que no producen formación de anti-cuerpos en el animal normal inyectado, pero parecen haptenos, es decir, poseen un grupo químico capaz de reaccionar con el anticuerpo, y que confiere especificidad antigénica a cualquier proteína a la cual se ha adherido, pero que, cuando no adherido a la proteína es incapaz por sí solo, de incitar formación de anticuerpos (34).

Un polisacárido de peso molecular 7.200 tiene acción quimiotáctica sobre los neutrófilos, precipita en sueros de animales inmunes, pero no es tóxico ni antigénico (3).

En resumen, se puede decir que las propiedades atribuidas a los constituyentes del bacilo, corresponden en todo caso a bacilos cultivados *in vitro*, y sabemos que la composición puede variar con la composición de los medios de cultivo. Por otro lado, en las investigaciones llevadas a cabo para determinar dichas propiedades, se han empleado siempre extractos que deben haber sufrido una serie de procedimientos capaces de alterar el complejo sistema que es un organismo bacteriano intacto. En fin, el medio tisular provee al organismo de condiciones imposibles de repetir en el laboratorio.

Acción de los tubérculo-lípidos. Ninguno de los lípidos aislados del cuerpo bacilar tienen apreciable poder tóxico para el organismo, animal. Libres de proteínas no inducen estado de hipersensibilidad, aunque coadyuvan posiblemente la acción de las mismas para establecer hipersensibilidad.

Cierta fracción lipídica del bacilo estimula el desarrollo del tubérculo característico de la enfermedad: células gigantes y rodeadas de células epitelioides. Los áci-

dos grasos tubérculoestearico y ftioico estimulan la producción de células epitelioides, (3). Las ceras insolubles provocarían la formación de células gigantes a cuerpo extraño (3). Seguramente el factor fundamental para la producción de este fenómeno fagocítico mononuclear, sería la insolubilidad de estos materiales en los tejidos. No obstante, esta reacción no está cuantitativamente relacionada con el contenido de lípidos en el bacilo: el bacilo intacto provoca mayor reacción relativamente a la cantidad de lípidos que contiene. Por otra parte, lípidos extraños de otras bacterias, provocan también reacción a células epitelioides, no obstante de que las reacciones propias a ellas no son tales en las infecciones espontáneas que producen (34).

Una fracción fosfátida actúa como verdadero antígeno, pero no parece intervenir en la resistencia a la tuberculosis ni provocar hipersensibilidad (34).

Varios AA. han afirmado en trabajos recientes (3, 4, 5, 6,) que no se puede admitir la existencia de tubérolotoxinas. Al menos no han querido admitir esta aserción que ha sido manifestada por los clásicos (47) dada la inexistencia de demostraciones experimentales indiscutibles.

El llamado "cord factor". Desde los trabajos de Bloch y sus asociados, parece estar comprobada la existencia de un factor tóxico en las especies virulentas del *M. tuberculosis*.

Middlebrook y col. fueron los primeros en conceder importancia a la disposición de los bacilos en cordones: las cepas virulentas y algunas cepas BCG, tanto en medio sólido como en medio líquido, crecen formando cordones o cintas, consistentes de bacilos dispuestos en estrecho paralelismo, mientras los bacilos de cepas avirulentas sólo se acumulan formando grumos (48). Los mismos autores sugirieron la posibilidad de que esta particular disposición se debería a la presencia de un compuesto, producto de excreción de los mismos, capaz de mantener adheridos a los elementos resultantes de la multiplicación (49). Para la mayoría de cepas, la formación de "cords" y la virulencia son correlativos, mien-

tras más virulenta la cepa, forma cordones más estrechos, bajo condiciones apropiadas. Algunas sustancias tenso - depresoras como Tween 80, dificultan dicha disposición, mientras extractos de embrión de pollo la favorecen y acentúan. Además, cierta reacción química de coloración, obtenida sólo con bacilos virulentos, pero no con avirulentos, sugiere también diferencias químicas en la constitución de superficie (50).

Bloch y col. (51) evidenciaron la presencia del factor responsable del fenómeno y determinaron su carácter tóxico. Lo denominaron por su origen, "cord factor".

Se ha determinado posteriormente con bastante exactitud la toxicidad del "cod factor" en extractos todavía bastante impuros (51, 52, 53, 54,); la extracción se efectúa utilizando aceite de parafina o éter de petróleo, hidrocarburos solventes orgánicos que dan lugar a la ruptura de los cordones típicos de las cepas virulentas (51). Estos extractos contienen naturalmente otros compuestos lipoideos de la superficie del bacilo y desde luego la proporción de ellos es mucho mayor, lo cual seguramente ha ocasionado que investigadores precedentes no hayan podido descubrir la presencia del factor tóxico. En suma, el "cord factor" está compuesto de varias fracciones, de las cuales la tóxica forma menos del 1%, y puede pasar enmascarada.

Se han determinado las siguientes propiedades biológicas para esta fracción tóxica obtenida por extracción con éter de petróleo: a) inhibe la migración de leucocitos in vitro. b) es tóxico para el ratón en inyecciones repetidas en pequeñas dosis (iny. de 0.005 mg.) pero una sola dosis alta, (hasta 2.0 mg.) no da lugar a manifestaciones tóxicas. c) las manifestaciones tóxicas que se producen son: pérdida de peso desde los primeros días, síntomas constitucionales y muerte, siempre después del 9º día. A la autopsia, se constatan hemorragias pulmonares generalizadas. d) La susceptibilidad de los ratones y cobayos a la acción tóxica en inyecciones repetidas, guarda estrecho paralelismo con la sensibilidad a la infección por la cepa de la cual proviene el factor. La inyección del extracto en cobayos, no induce un esta-

do de ractividad alérgica a la tuberculina, y al contrario, cobayos tuberculino-sensibles no reaccionan frente al extracto, (51).

Los bacilos privados de la envoltura lipídica, aunque no pierden viabilidad ni patogenicidad, producen en cobayos enfermedad de evolución más lenta que la producida por bacilos intactos (parece existir un período de latencia hasta que los bacilos puedan descubrirse de la evoltura tóxica). Los bacilos "desnudos" pierden además la capacidad de inhibir la movilidad, migración de poliformonucleares.

El "cord factor" obtenido de varias cepas humanas y bovinas presenta varias diferencias biológicas, lo cual sugiere que deben tener ciertas diferencias en su constitución química.

No se ha aislado todavía el "cord factor", pero los extractos etéreos pueden ser concentrados y purificados, sin pérdida de potencia y manteniéndose las propiedades biológicas estables y características (52).

Se puede aislar 10-9 gammas del material tóxico de cada bacilo. Por otros cálculos, los autores llegan a la conclusión de que cae en el orden de magnitud de otros productos biológicos de esta índole.

No se ha identificado todavía la fracción tóxica (53), pero se sabe que se encuentra en la porción acetona-soluble de la "cera pura", y parece estar estrechamente relacionada con el ácido micólico, aunque no es precisamente un ácido. El peso molecular corresponde al de dicho ácido, y parece contener un átomo de nitrógeno por molécula. Por reducción o hidrólisis desaparece la toxicidad.

El "cord factor" se encuentra en mayores cantidades en los cultivos jóvenes de las cepas virulentas: los cultivos viejos contienen más bien, mayor cantidad de lipopolisacáridos que tienen escasa toxicidad (54).

c. Significado de la virulencia.

"El grado de virulencia de un cultivo va siempre referido a una especie zoológica dada". Es la orientación de los AA. Italianos sobre este problema discutido desde muchos puntos de vista. Y, en efecto, cualesquiera que

sea el mecanismo por el cual el bacilo es capaz de causar enfermedad, esta capacidad se apoya en una particular constitución orgánica del huésped en una especie animal, que permite la supervivencia del parásito en sus tejidos. Esta capacidad puede ser mayor o menor, siempre referida a la misma especie.

La diferencia existente entre un microorganismo patógeno y uno saprófito, consiste en que este último, aunque pueda penetrar en los tejidos del cuerpo animal, no puede proliferar porque encuentra que las condiciones inadecuadas para su biología.

Ahora bien, el agente **patógeno**, al proliferar aprovechando de los elementos ofrecidos por el huésped, provoca en sus tejidos una reacción; aún más, al eliminar los productos de su metabolismo bacteriano, la reacción consecutiva tiene que oponerse a la acción nociva de tales productos. Las reacciones que se operan en el huésped pueden ser locales o generales, dependientes de la capacidad del germen de invadir los tejidos. Esta interacción huésped - parásito, es lo que constituye enfermedad, significando así más bien un proceso que un estado biológico.

Según la **virulencia** del germen, este proceso puede ser transitorio, determinándose en último término la eliminación del agente patógeno —de baja virulencia— gracias a mecanismos de defensa del organismo animal, o puede significar una enorme destrucción de tejidos o un envenenamiento, plasmático irreversible —agente de alta virulencia— fenómenos capaces de matar el organismo animal.

Es decir, en otros términos, el agente capaz de producir enfermedad, agente patógeno, puede tener un cierto grado de toxicidad, estos factores están caracterizando su **grado de virulencia** (47).

Para Rich, el curso y carácter de las lesiones en un organismo parasitado, dependen de dos factores: virulencia bacteriana y resistencia del huésped, pero como **dos variables independientes** (34). Es decir que una **especie** sea poco resistente a la acción de un germen, no significa que dicho germen sea muy virulento para esa

especie animal, pues la virulencia es un fenómeno independiente, determinado primariamente por la constitución de la bacteria, y puede ser alterada modificando las condiciones del cultivo. Por esto que, para muchas bacterias, neumococo por ejemplo, se conoce el substrato en que "reposa" la virulencia y aunque para el micobacterio este conocimiento apenas se inicia, se puede adelantar el dato de que también se puede **atenuar** su virulencia bajo condiciones culturales especiales.

Siendo susceptible de "atenuación" o de "exaltación" experimentales, la virulencia es independiente de la resistencia natural de una especie animal. La mayor o menor resistencia de una especie, no están indicando sino una particular característica cualitativa de sus tejidos que pueden ofrecer, específicamente a un tipo de germen, los elementos necesarios para su implantación y supervivencia. Por eso que se puede "hacer" cepas virulentas para una especie animal y cepas menos virulentas para la misma especie animal, pero las dos cepas, simplemente siguen siendo patógenas. En otras palabras, virulencia implica intensidad, mientras patogenicidad más bien significa capacidad, de producir enfermedad.

El clásico concepto de Azzi relacionando virulencia y especie ha sido vertido por Rich así: "si se quiere medir la virulencia, el grado de patogenicidad, se ha de utilizar la especie animal nativamente susceptible y en condiciones normales, sin resistencia ni sensibilidad provocadas" (34).

Se llama una bacteria **patógena** cuando, introducida en pequeños números en el organismo animal normal, puede producir un proceso mórbido local o general: la transitoriedad de dicho proceso, dependería de la virulencia. Por esto se dice también que la virulencia expresa el **grado de patogenicidad** (4, 5, 34, 47).

Si se considera que lo que se necesita para producir lesiones en los tejidos del huésped susceptible es un número suficiente de bacilos, es lógico concluir que ese número es menor cuando se trata de un germen muy virulento, que cuando se trata de uno menos virulento. De aquí, Rich (34) deduce que "**virulencia es la habilidad**

relativa de una cepa para sobrevivir y para reproducir progresivamente en los tejidos de individuos normales de una especie animal nativamente susceptible”.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

1—Aislamiento y cultivo del bacilo

a. Generalidades.—Para efectuar cultivos se puede partir de diferentes materiales patológicos de origen humano o del animal inoculado. Las técnicas se reducen en suma, a homogenizar dichos materiales, tratarlos con diferentes antisépticos y antibióticos para evitar la germinación de bacterias contaminantes. Los métodos más conocidos son los aconsejados por Lowenstein y Petroff, particularmente para esputos, según los cuales se destruye el moco y se homogeniza, utilizando ácido sulfúrico al 10% o sosa al 20%; estos agentes pueden destruir unos cuantos bacilos, pero luego de un corto período de exposición y neutralizando, se puede sembrar en terrenos apropiados, con buen resultado. Se puede sembrar también dichos materiales en terrenos que contienen antisépticos débiles como verde malaquita. En estos terrenos se obtienen colonias puras del agente patógeno en la primera siembra, después de la segunda semana de incubación a 37°C.

Si se emplean antibióticos, la penicilina en una concentración de 50-100 U.I. por centímetro cúbico del homogenizado o material original, después de 1 h. de exposición a 37°C. asegura completa pureza del cultivo. No obstante, Kirby y Dubos (55) demostraron la sensibilidad del bacilo a la penicilina: dosis muy altas, desde 600 U/cc. pueden inclusive lisar los bacilos y, para pequeños inóculos, también son nocivas dosis pequeñísimas. Los franceses emplean con buenos resultados la aureomicina en concentraciones de 2.5mg./cc. (56)

También se utiliza el terreno sintético Tween-albú-

mina en el que se puede obtener germinación del bacilo partiendo de materiales muy poco concentrados y en un período mucho menor del esperado en los terrenos ordinarios de huevo. En este terreno, la sensibilidad del bacilo a los antibióticos y antisépticos aumenta grandemente (57).

Para inoculaciones diagnósticas, se emplean el cobayo y el conejo; el cobayo es el animal más sensible al bacilo tipo humano. Según la descripción clásica, se debe esperar una tuberculosis generalizada (tipo "Villemin") en este animal, después de las seis semanas siguientes a la inoculación subcutánea. El animal muere al 2º o 3er. mes, y raramente hasta al sexto. La sensibilidad a la tuberculina se manifiesta desde la segunda semana a dosis de 0.1 cc. de T.A. Pero, según observaciones de Muggia (58) entre nosotros, es poco frecuente este tipo de tuberculosis consecutivas a la inyección de material positivo. En nuestros animales, por causas todavía no aclaradas, lo más frecuente es una tuberculosis localizada, del tipo descrito para gérmenes de virulencia atenuada: ganglios linfáticos caseosos, a más del foco necrótico en el sitio de la inoculación. Es necesario esperar varios meses antes de notar signo alguno de enfermedad tuberculosa en el animal inoculado, observándose frecuentemente aumento de peso y una supervivencia inusitada de hasta 24 meses.

Finalmente, se puede efectuar también la inoculación del material sospechoso en el saco vitelino de 6 huevos embrionados de 6-8 días. Incubándolos a 37°C. se pueden examinar los resultados desde el 4º día, diariamente en un huevo. Según los AA. del método (59), es posible declarar negativo el material si hasta el 6º huevo (10º día) no se encuentra el bacilo. La técnica de examen es muy sencilla: se homogenizan agitando 2 o 3 cc. del contenido vitelino con 20cc. de agua destilada; luego se añade 2 cc. de fenol cristalino fundido al calor, para matar los bacilos, se agita 3 minutos y se deja reposar por lo menos 2 horas: se provoca la concentración por flotación de los bacilos que se los busca luego en frotis hechos con el sobrenadante superficial tomado con pi-

peta capilar, sin absorber, y coloreados por el método de aislamiento y cultivo del bacilo tuberculoso, es necesario determinar su virulencia por inoculación a cobayos e incluso asegurarse de la variedad por inoculación a otros animales (ver tabla I, pág. 17). Desgraciadamente, el grado de virulencia y la estabilidad de la misma, son propiedades que se determinan a lo largo de muchos años de utilización de una cepa, y con fines de investigación, NO SE PUEDE ASUMIR la idea de estar manteniendo en todas las pruebas caracteres invariables, si esto no está demostrado.

Por esta razón, para el presente trabajo, se ha utilizado la cepa internacional H37Rv. La cepa original H37, fué aislada en 1905 por el doctor E. R. Baldwin (Saranac Laboratories), del esputo de un joven de 19 años que sufría de una tuberculosis pulmonar crónica.

En los últimos años, prácticamente todos los trabajos de investigación se realizan utilizando la cepa original, o una de sus variedades, la cepa Rv, porque, al contrario de lo que sucede con otros microorganismos trasplantados por mucho tiempo en medios artificiales, conserva estable su virulencia inicial y es capaz de producir la clásica tuberculosis generalizada en el cobayo (60).

Es posible la aparición de colonias de una variante avirulenta en cultivos de la cepa H37. Esto sucede manteniéndola por mucho tiempo en caldo glicerinado, en agar glicerinado y en medios complejos naturales de huevo (como el de Petroff.) Las dos colonias separables son rugosas (**R**) la una establemente virulenta (**Rv**) como la original y la otra avirulenta (**Ra**), con características culturales diferentes. No se puede decir todavía si se trata de verdaderas formas de disociación, pero se sabe que se puede evitar la aparición de la forma **Ra** manteniendo cultivos "patrón" en medios sintéticos como Proskauer y Beck.

c. El cultivo patrón para el presente trabajo se ha efectuado en medio de Lowenstein. La cepa H37Rv ha sido trasplantada en este medio, cada 30 días. Por otro lado, se han mantenido varios cultivos en tubos con 6cc. del medio líquido Tween-albúmina, trasplantando cada

7-9 días 0.1cc. del cultivo anterior. La proliferación es suficientemente abundante para que, preparando como se indica más abajo este cultivo pueda ser utilizado de inóculo.

La fórmula original del terreno líquido Tw-Alb. corresponde a Dubos y Davis (57). Se ha empleado la fórmula modificada. "TB Broth Base" (Difco); ésta contiene por 1000:

Extracto de levadura	2.0	gramos
Proteosa peptona	2.0	gramos
Casitona	2.0	gramos
Na ₂ HP0 ₄ . 12H ₂ O	2.5	gramos
KH ₂ P0 ₄	1.0	gramos
MgS0 ₄ . 7H ₂ O	0.6	gramos
Na ₃ .citrato.2H ₂ O	1.5	gramos
Tween 80	0.5	gramos
Glicerina pH7.0	50.0	gramos

El Tween 80 es una substancia tensoactiva, hidro—y liposoluble—, caracterizada por la posesión de propiedades hidroféllicas (alcoholes poli-hidroxi-etilénicos) de propiedades lipofílicas (cadenas alifáticas del ácido graso) ("). Es absorbido por la superficie hidrofóbica del bacilo tuberculoso y su efecto "mojante" permite una distribución difusa del mismo en el medio acuoso. Parece que la "mojada" de la superficie bacteriana facilita el intercambio metabólico entre el microorganismo y el medio, incrementando la velocidad de crecimiento. La albumina bovina (Fracción V del plasma) que se añade al terreno (10 cc. por 100) (*) neutraliza efectos tóxicos de pequeñas cantidades de ácidos grasos libres en el Tween o liberados por acción de una lipasa del mismo bacilo (57,50a).

El cultivo de 7-9 días se encuentra fisiológica y químicamente homogéneo. Al cabo de este tiempo, la proli-

(")—Ester poli-hidroxi-etilénico del sorbitan monooleato.

(*) Soln. al 5% en solución salina normal con 7.5% de dextrosa.

feración es suficiente para asegurar la presencia de 10^8 bacilos por mm.c. del terreno (50a).

Los datos de la literatura y algunos ensayos previos, permiten prever que, dentro de ciertos límites, las ligeras variaciones en las dosis de bacilos que se inoculan a cada embrión, no tienen importancia en los resultados. Las dosis apropiadas se encuentran entre 0.1 y 0.01 mg. Por esta razón, las dosis inoculadas a cada embrión en el presente trabajo no han sido minuciosamente pesadas y solamente se ha llevado un control nefelométrico de la proliferación bacteriana en medio líquido.

d. El inóculo propiamente dicho se ha preparado así: el cultivo de 7 a 9 días a 37°C ha sido centrifugado 2.500 rpm. durante 30 min. El sedimento ha sido lavado por dos veces con solución salina estéril (NaCl al 8.5%), centrifugando en cada vez. Finalmente, el sedimento ha sido suspendido en solución salina estéril, llevando a un volumen final igual a $1/3$ del original de 3 a 1 para asegurar una cantidad suficiente de gérmenes en el volumen inyectado sobre la membrana corio-alantoi-dea: 0.25 cc.

En resumen, el inóculo para cada MCA, es de ca. 0.1 mg. de bacilos suspendidos en 0.25 cc. de solución salina. La suspensión se realiza a partir de un cultivo de 7 a 9 días en terreno (llamado) de Dubos, lavado y concentrado 3:1.

e. Controles.—Se han realizado pequeñas series de inoculaciones con la cepa BCG y de inyecciones de solución fisiológica estéril, bajo las mismas condiciones técnicas que para los embriones motivo de investigación.

Se ha efectuado también cortes seriados de hígado y bazo en algunos embriones, a fin de descubrir posibles localizaciones en esos órganos.

A fin de tener una idea sobre el carácter de la infección experimental en cobayos, con la cepa H37Rv, fueron inoculados 3 animales en Quito y 3 en Guayaquil, con la misma dosis administrada a cada embrión. Naturalmente, con tan pequeño número no se ha intentado una interpretación absoluta de los resultados: este solo

problema puede ser asunto de varios meses de investigación experimental. No obstante, tiene cierto interés el conocer los resultados (v. Cap.III).

2. Técnica sobre embriones de pollo.

El embrión de pollo ha sido utilizado en el laboratorio desde el siglo pasado, en investigaciones embriológicas. Levaditi en 1906 (61), al estudiar la espirosis de las aves de corral, describió por primera vez la inoculación de la membrana coriolantoidea (MCA) y desde entonces, muchos autores han ampliado los conocimientos sobre su empleo como huésped en infecciones experimentales. (ver fig.1).

mentales, a la vez que han perfeccionado los procedi-

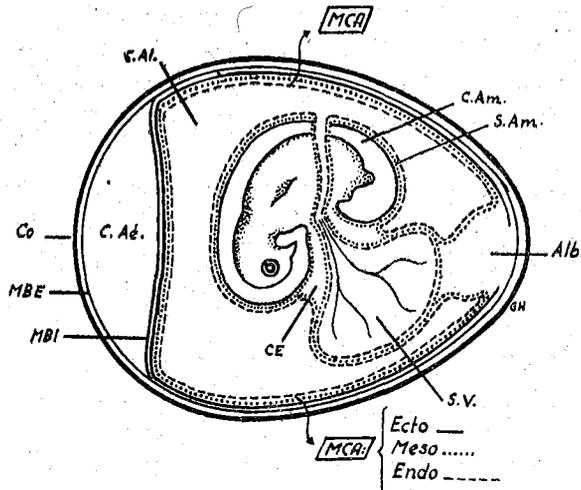


Fig. 1.—Corte esquemático del huevo embrionado de 9 días. MCA membrana coriolantoidea. C. Al. cavidad alantoidea. C. Am. cavidad amniótica. S. Am. saca amniótica. Alb. albumen. C. A.é. cámara aérea. C.º, cáscara o concha. MBE membrana blanca externa. MBI membrana blanca interna. C. E. celoma extraembrionario. S. V. saco vitelino.

Los primeros trabajos se refieren a la implantación del sarcoma transmisible de las aves y de tejidos embrionarios de mamíferos (62,63). Goodpasture y otros AA.

desde 1931 reconocieron las potencialidades de este método de investigación. Su técnica se basó en las primeras descripciones de Clark (64), sobre los métodos seguidos en investigaciones embrionológicas, pudiendo observar en secciones histológicas de la MCA, la reproducción de las lesiones características de la enfermedad, consecutivas a la inoculación de virus vacunales y rickettsias (65, 66, 67).

Varios AA. han estudiado también la acción de agentes físicos y de sustancia inertes sobre la MCA, determinando la enorme capacidad reaccional de las cepas embrionarias, y la actividad fagocitaria de sus células (68, 69, 70).

Los primeros investigadores que han estudiado sistemáticamente la infección bacteriana de la MCA del embrión de pollo, han sido seguramente Goodpasture y Anderson (71). Estos AA. observaron que los estafilococos y estreptococos producen necrosis superficiales, sin invadir los tejidos; el bacilo diftérico crece superficialmente y mata el embrión por sus toxinas; *S. typhi* y *Br. abortus* atraviesan el ectodermo fácilmente y por fin, el bacilo tuberculoso aviar produce lesiones características. Buddingh and Polk y Bang estudiaron el proceso patogénico de infecciones experimentales con meningococos y gonococos (72, 73).

La literatura relacionada con la inoculación de la MCA con micobacterias no es abundante. Goodpasture y Anderson lograron cultivar *M. tuberculosis avium*, que es capaz de invadir el ectodermo y el endodermo y produce nódulos específicos ya al 4º día de inoculación (71). Otros AA. también han obtenido crecimiento nodulares a los 7 días, utilizando cepas humanas y aviares (74).

Moore (75, 76) después de obtener cultivos de hongos patógenos, pensó que la MCA del embrión de pollo podría ser de gran utilidad para cultivar bacterias ácido-resistentes, por su estrecha relación sistemática y por el parecido de las lesiones que producen (granulomas). Por otro lado, tanto los hongos como estas bacterias producen enfermedades de larga duración y sería

de gran valor encontrar un huésped en el que en pocos se pudiera seguir la evolución de las lesiones, con su carácter específico y fácilmente diferenciables al examen histopatológico (77, 78, 79).

Además de los trabajos de Moore, contribuyeron Emmart and Smith (80, 83), Canat and Opie (81) y Fite and Olson (82), utilizando cepas virulentas y avirulentas, con los primeros estudios detallados sobre la histopatogenésis de la tuberculosis experimental de la MCA. Moore y Emmart and Smith llegaron a establecer la posibilidad de relacionar directamente la virulencia de los gérmenes empleados y la magnitud y tipo de las lesiones, pero Fite and Olson discutieron el valor de sus conclusiones, aunque sin lograr demostraciones opuestas.

Numerosos investigadores han desarrollado los métodos de utilización de los embriones de pollo, particularmente para preparación de vacunas, aprovechando diferentes tejidos y medios embionarios; el progreso más reciente se relaciona con el hallazgo de las formaciones más apropiadas para el desarrollo de cada virus, rickettsia o bacteria en particular. Así mismo, se ha avanzado mucho en el empleo de los tejidos del embrión de pollo para estudiar trasplantes de tejidos adultos o neoplásticos de mamíferos.

De los datos proporcionados por la literatura, el embrión de pollo parece ser el huésped apropiado, óptimo, para el estudio de infecciones experimentales, por su sensibilidad al germen patógeno y porque ofrece un escaso número de variaciones dependientes del medio, o por lo menos, dichas variaciones pueden ser controladas con bastante seguridad en el laboratorio.

a. Provisión de huevos.—Para el presente trabajo se han seguido las indicaciones de Goodpasture y Budingh (84) y de Beveridge y Burnet (85). Hubo que asegurarse de que los huevos que se iban a utilizar en la experimentación provinieran de gallinas sanas y de plantales o incubadoras comerciales con bastante limpieza y mínima contaminación. En todo caso, era preferible la utilización de huevos de gallinas de razas puras y del

mismo lote (uniformidad de factores genéticos). En lo posible, se ha trabajado con huevos de peso uniforme y de cáscaras de color claro que permiten mejor visibilidad en el "embrioscopio".

b. Examen del embrión.—Se utilizó un dispositivo ("embrioscopio") con una lámpara potente, que permite ver el contenido del embrión por transiluminación. Se puede utilizar una pantalla de paredes oscuras con un orificio de tamaño y forma convenientes. Al 4º día de inoculación se ve nítidamente el embrión y sobre todo el ojo, como un punto negro. A veces se aprecian los latidos cardíacos. Al 9º día, el de la inoculación, hay que fijar nítidamente la disposición de los gruesos vasos superficiales (vitelinos), para localizar el punto más conveniente para cada tipo de inoculación, y la localización y disposición de los bordes de la cámara de aire, sobre todo cuando se va a realizar la inoculación a través de ella, como en el presente trabajo. Cuando ha muerto el embrión, se ve su sombra depositada contra la cáscara y los vasos inferiores nítidamente marcados, más oscuros, seguramente debido a sedimentación de los glóbulos rojos; la ausencia de movilidad simplemente, tomada como signo indicativo, no da mucha seguridad por la variable movilidad de un embrión a otro.

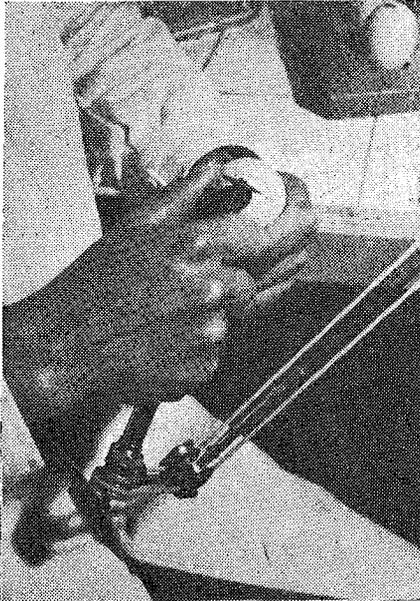
c. Incubaciones.—Los huevos fueron sometidos a dos incubaciones: la primera de 9 días para embrionar, y la segunda de 6 días, experimental. La primera incubación en incubadoras comerciales, de regulación automática, con temperaturas oscilantes en menos de 1°C. al rededor de 38, y una humedad oscilante al rededor de 70%. Durante la incubación, se cambió la posición de los huevos convenientemente de acuerdo con tablas existentes en las incubadoras. En estas condiciones, hubo formación de embrión y ligerísimo aumento de la cámara de aire (este aumento depende más de la humedad existente). La fertilidad de los huevos osciló para los diferentes lotes, entre 25 y 90% (Guayaquil 50-80%). La mortalidad posterior a la inoculación fué menor del 10% y depende naturalmente de los riesgos de la técnica, menores con mejor entrenamiento.

Los huevos infértiles o con embrión muerto, fueron descartados a los 7 días de la primera incubación.

La segunda incubación se efectuó a continuación de las inoculaciones realizadas en embriones de 9 días. Durante el proceso de inoculación, los huevos se mantuvieron a la temperatura ambiente (21-22°C.) por un tiempo máximo de 30 min. Una vez inoculados los huevos fueron dispuestos en el termóstato bacteriológico que mantiene condiciones uniformes de temperatura y humedad. Esta segunda incubación duró 6 días, o sea que, a la lectura o apreciación de los resultados, los embriones alcanzaron 15 días de edad. Durante esta segunda incubación, los huevos sufrieron una ligera movilización, diariamente por una sola vez.

d. Inoculaciones.—Se conocen varios tipos de inoculaciones: en el saco vitelino, en la MCA a través de una ventana y con la formación de cámara de aire artificial, en la cavidad amniótica en las diferentes partes del embrión mismo o por vía endovenosa (84, 85) (ver fig. 1).

Después de muchas fallas para este trabajo se adoptó el siguiente procedimiento:



1°—Se practica la apertura de una ventana de 10 x 5 mm, en la cáscara, sobre la cámara de aire, muy cerca de uno de sus bordes, en la parte más vascularizada. La cáscara se corta fácilmente con un disco de carborundo y utilizando una máquina de dentistería o un taladro (Ver fig. 2.)

(Figura N° 2)

Apertura de una ventana sobre la cámara de aire.

II.—Al levantar el trozo de cáscara cortada, se descubre la membrana blanca externa subyacente, que se retira con una pinza, dejando así abierta la cámara de aire y visible la membrana blanca interna de la misma.

III.—Para inyectar, se utiliza jeringuilla de tuberculina y aguja N° 23. Se introduce la punta de la aguja con el bisel hacia abajo, sin puncionar, entre la membrana blanca interna de la cámara de aire, y la membrana coriolantoidea que queda inmediatamente subyacente y adherida a la primera. Luego de introducir la aguja, se asegura de no haber penetrado en la cavidad alantoidea por absorción suave. Se puede despegar las dos membranas, ligeramente levantando la blanca con la punta de la aguja, con lo cual entra una pequeña burbuja de aire que la comba. (Ver fig 3 y fig. 4).

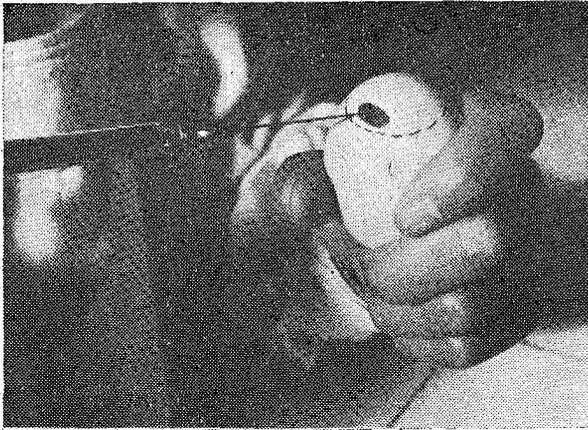


Fig. 3.—Inoculación

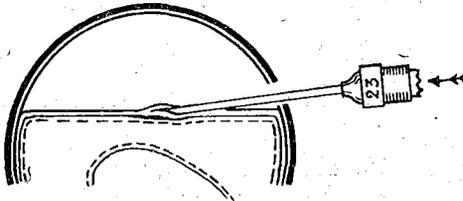


Fig. 4.—Inoculación, corte esquemático

IV.—Se inyecta lentamente para que se difunda el inóculo, la cantidad indicada: 0.25cc.

V.—Terminada la inoculación, se cierra la ventana de la cáscara con una cinta plástica, y se dispone los huevos para la incubación experimental, con la cámara de aire hacia arriba, ligeramente inclinados.

3.—Condiciones ambientales de cultivo

Manteniendo uniformes las condiciones de laboratorio, se puede decir que los experimentos para el presente trabajo, se han llevado a cabo en ambientes cuyas características varían teóricamente sólo en dependencia de las presiones barométricas respectivas, para Quito y Guayaquil.

Prácticamente, la única diferencia existente entre los dos ambientes gaseosos experimentales, es la tensión parcial de oxígeno: en Quito es 44 mm. Hg. menor que en Guayaquil. Esta diferencia, equivaldría refiriéndose a valores absolutos, (a nivel del mar), a una concentración de 15.1 volúmenes por ciento de O₂, para Quito, (Ver tabla II).

TABLA II

	Guayaquil	Quito
Altitud	n. del m.	2.860 m.
Presión barométrica media	758mm.Hg	547.7mm.Hg
Tensión parcial de oxígeno	159mm.Hg	115 mm.Hg
Tensión parcial de CO ₂ . .	0.3mm.	————

Equivalentes de O₂ en vol. %

Guayaquil 20.94%

Quito 15.1 %

4.—Histología .Relación de las lesiones con la virulencia

a.—**Técnica histológica.—Fijación:** Antes de separar la porción utilizable de la MCA, se hizo la fijación "in situ" con formalina al 10%, para aumentar la consistencia de la membrana y facilitar el corte con unas tijeras finas. Una vez separada, la fijación posterior de

la MCA se hizo también en formalina al 10%, por 24 a 48 horas.

Lavado: después de la fijación, durante 8 horas en agua corriente.

Inclusión: la deshidratación previa, en alcoholes ascendentes, luego aclaramiento en toluol. Se utilizaron tres baños de parafina: 46, 50 y 56 grados C.

Coloración hematoxilina-eosina: Se utilizó hematoxilina de Harris y eosina al 1% en solución hidroalcohólica conocida (86).

Coloración de Gallego, modificada: se realiza primero coloración de bacilos con fúcsina de Ziehl, con ligero calentamiento. Se decolora con alcohol clorhídrico al 3% durante algunos segundos, y se lava con agua corriente.

Luego se colorea núcleos con fucsina acética de Gallego (87), durante 5 minutos, (fucsina de Ziehl V gotas, ácido acético glacial 1 gota, agua destilada 10cc.)

Virofijación durante 10 minutos, con formol acético (formalina pura 11 gotas, ácido acético glacial 1 gota, agua destilada 10 cc.) El corte toma un tinte rosado oscuro. Lavado con agua corriente.

Coloración de fondo con solución de picro-índigo-carmín, durante 2-3 minutos (solución acuosa al 1% de carmín de indigo 1 vol., solución acuosa saturada de ácido pícrico 2 vol.) Sin lavar con agua, se deshidrata con alcohol absoluto y se aclara con xilol.

Montaje al bálsamo.

Con esta coloración, los bacilos se presentan violeta oscuro, los núcleos se tiñen en violeta-rosado, los citoplasmas en azul o verde; el tejido colágeno en azul, las estructuras acidófilas en verde o amarillo. En las membranas, lo más frecuente es encontrar las células ectodérmicas coloreadas en verde y las endodérmicas en rosado claro. Células keratinizadas en amarillo.

Se realizó también en muchos casos la coloración ordinaria de Ziehl, utilizando azul de metileno como fondo. Con esta coloración es más difícil diferenciar los varios tipos celulares, pero más fácilmente se contrastan los bacilos.

b. Histopatología, y relación de lesiones con virulencia.

El problema, tal como se presenta a través de la literatura (71, 75-83), es bastante sencillo, y en el fondo no se trata sino de adoptar una notación apropiada para calificar el tipo y la intensidad de las lesiones.

Fundamentalmente, la reacción producida en las membranas es cualitativamente similar, de carácter específico, por implantación de bacilos virulentos, poco virulentos, avirulentos e inclusive muertos al calor. Macroscópicamente, se observan lesiones nodulose gruesas o focos dispersos de color blanquecino, en un fondo más o menos opaco, engrosado o edematoso del resto de membrana. Estas lesiones, microscópicamente son conglomerados más o menos estrechos de tubérculos en diverso estado de desarrollo, con algunos o todos los elementos característicos de este tipo de lesiones.

Aparentemente, según los trabajos previos citados, el predominio de cierto grupo celular caracterizaría la respuesta correspondiente a cada una de las variedades de bacilos tuberculosos, y también de bacilos saprofitos, cromógenos. La cantidad o intensidad de respuesta, caracterizaría el grado de virulencia de cada cepa.

Así, macroscópicamente consideradas, las membranas inoculadas con cepas virulentas, presentan en un 96% tubérculos gruesos, mientras con cepas avirulentas, la frecuencia llega sólo a 18% (83); Para unos AA. solamente 40-50% de membranas inoculadas con cepas virulentas presentan gruesas lesiones (82). (desgraciadamente, no se encuentran apreciaciones estadísticas en ninguno de los trabajos). La mayor frecuencia de focos dispersos corresponde a inoculaciones con dosis pequeñísimas de bacilos virulentos, o con cepas avirulentas, (79, 82).

Microscópicamente, con dosis iguales de cepas humanas virulentas, hay reacción ectodérmica y mesodérmica. En el ectodermo, hiperplasia, proliferación y estratificación epitelial. En algunas ocasiones, infiltración inflamatoria o pérdida de continuidad del mismo, por ne-

crosis. En muchos casos hay hiperkeratinización aparente, con descamación epitelial o invaginaciones que forman las llamadas "perlas" en cuyo interior se encuentran bacilos intracelulares. Los bacilos se encuentran superficiales, fagocitados o dispersos libremente proliferantes. En el ectodermo, intracelulares en grumos o paquetes.

La reacción mesodérmica es más notable e intensa. Hay gran infiltración en un mesodermo aumentado y proliferado, con formación de tubérculos: se encuentran desde simples racimos de células y monocitos entremezclados con fibroblastos, hasta tubérculos grandes con necrosis y caseificación (Moore Emmart), rodeadas de grupos de células gigantes, en disposición característica. La necrosis es poco frecuente y la caseificación muy rara. Rara vez también hay reacción de tipo fibroso que invade o rodea el centro del tubérculo. Los tuberculos parecen iniciar la necrosis por ruptura de capilares sanguíneos, para constituirse al fin en tubérculos "blandos" (Moore, 79). En todo caso, la vascularización está aumentada sobre todo en zonas de gran reacción y alrededor de tubérculos. Es muy frecuente observar vasos rodeados por gran cantidad de leucocitos migratorios.

En resumen, las lesiones grandes están formadas por tejido tuberculoso de granulación, con gran cantidad de bacilos distribuidos en las zonas de mayor reacción. La multiplicación de bacilos es rápida y abundante, claramente mayor que en el caso de cepas bovinas o aviares, y mucho mayor que en el caso de cepas avirulentas. A más de la gran respuesta celular, hay edema notable, seguramente de carácter tóxico (77, 79).

La reacción provocada por implantación de bacilos bovinos y aviares virulentos, es comparativamente menor que la provocada por iguales dosis de cepas humanas virulentas. Lo más sobresaliente es la gran reacción ectodérmica, con keratinización o cornificación epitelial, invaginación y formación de "perlas" ectodérmicas, sobre todo con bacilos bovinos. Con bacilos aviares, lo más notorio es la presencia de fagocitos, incluso deriyados del epitelio ectodérmico. Los bacilos se encuentran

siempre fagocitados, en pequeños grumos o paquetes apretados. En ambos casos, con cepas bovinas y aviares, hay formación de tubérculos que no llegan en ninguna ocasión a necrosis franca. Fuera de los tubérculos de apariencia jóvenes, hay escasa reacción celular de otro tipo y también débil infiltración del resto de membrana. Por pases sucesivos de embrión a embrión, es muy interesante que las cepas humanas y bovinas virulentas, van perdiendo vitalidad, mientras las cepas aviares al contrario, parece que se implantan y proliferan más fácilmente.

Con cepas avirulentas y bacilos muertos, las reacciones son débiles, no se forman tubérculos. Hay reacción a cuerpo extraño con formación de células gigantes y migración de mononucleares que engolfan a los bacilos; hay también migración de leucocitos hacia el foco de implantación del inóculo. A veces todos los bacilos están engolfados por células gigantes superficiales y no hay otra respuesta celular. Con bacilos de cepas muy virulentas, muertos al calor, el edema es muy pronunciado, y la respuesta celular débil, parecida a la provocada por bacilos aviares.

CAPITULO III

HALLAZGOS EXPERIMENTALES

a. Sobre los procedimientos técnicos.

Bajo las condiciones descritas para esta investigación experimental, se han empleado en Quito y Guayaquil, un total de 320 huevos. A los ensayos en Quito corresponden 210 huevos, de los cuales embrionaron 125 (59.5 %). Fueron inoculados 113 embriones a los 9 días de edad. Después de descartar los contaminados y los muertos prematuramente, quedaron al 6º día de incubación experimental, un total de 61 membranas para la fijación y preparación histológicas.

De los 110 huevos empleados en Guayaquil, la fer-

tilidad se manifestó en 83 embriones (75.45 %). Fueron inoculados finalmente 77 embriones, de los cuales se pudo obtener 65 membranas para el examen histológico. (Ver tabla III).

TABLA III

	Huevos	Embriones	Inoculad.	MCA fij.	MCA estd.
Quito	210	125	113	61	58
Guayaquil ...	110	83	77	65	55

La contaminación presente en algunos casos de los embriones inoculados (menos del 5%, se debió a hongos que se encuentran con frecuencia en el ambiente de laboratorio.

Es indudable que, tanto la fertilidad aparente, como la mortalidad en la primera y segunda incubación, en las primeras series de ensayos, reflejan claramente el sinnúmero de factores de orden técnico, que no fueron todavía bien controlados. De allí que comparando los diferentes ensayos por separado, dicha fertilidad aparente se eleva y la mortalidad disminuye, sucesivamente hasta los últimos. Por esto que, a pesar de que sería inexacto dar una cifra determinada, generalizando, se puede decir que hay que esperar la aparición de embrión en más del 80% de huevos considerados fértiles por las condiciones de fecundación, etc. De estos embriones, hay que esperar hasta una mortalidad del 10% antes de 9º día, sobre todo en el 3º y 4º en que se reconoce el primer período crítico de labilidad embrionaria. La mortalidad dentro de las 48 horas siguientes al momento de la inoculación, es mayor que en los días precedentes a ésta, pudiendo sobrepasar al 10% (en los primeros ensayos en Quito significó el 100%). Desechando los factores de orden técnico, esta mortalidad corresponde en parte a que, a la edad de la inoculación, los embriones están entrando en su segundo período crítico en que la mortalidad espontánea se eleva, por mayor labilidad metabólica (88).

En consideración de todos estos hechos, trabajando en buenas condiciones, se puede aprovechar para la inoculación, alrededor del 70% del total de huevos empleados, un acifra desde luego muy cómoda para cualquier trabajo de investigación, o para inoculaciones diagnósticas por la técnica de Brueck y Buddingh (59), por ejemplo, de tan valiosa aplicación.

La técnica de inoculación sobre la MCA, provocando antes la formación de cámara de aire artificial, tan frecuentemente recomendada para la inoculación del bacilo tuberculoso, dió muy malos resultados con mortalidad inmediata de hasta el 100% de embriones empleados en Quito, en uno de los primeros ensayos. Posteriormente fué menor, pero todavía muy alta. No sólo es una técnica que requiere de condiciones especiales de asepsia, sino que parece que ocasiona un traumatismo demasiado grande por la manipulación. Es interesante anotar que, al despegar la membrana formando la cámara de aire artificial, hay producción de hemorragias puntiformes en sábana, que seguramente influyen no sólo en el desarrollo posterior del embrión, sino también en el tipo y carácter de las lesiones, porque se implanta el germen sobre una superficie lesionada.

La técnica empleada en este trabajo (Cap. II), parece ser la más inocua. La MCA es más fácilmente despegable de la membrana blanca interna, y además, es posible que el mismo inóculo que va decolando las dos membranas, al extenderse suavemente, impida la producción de lesiones de despegue. Esta técnica ha sido utilizada por algunos autores para inocular el virus de la enfermedad de New Castle (89).

En los primeros ensayos previos, las membranas fueron fijadas en el líquido de Zenker que es seguramente el fijador de elección para inclusión en parafina y para estudios celulares. Es además el fijador aconsejado por los autores (75-83). Pero parece poco práctico para la coloración de Gallego, pues se notó una deficiente tinción nuclear con la fucsina. Todas las membranas utilizables, en esta experimentación fueron fijadas en formalina al 10%, que permite una magnífica coloración.

ción con hematoxilina-eosina, y la técnica de Gallego, modificada, que se destacan nítidamente entre sí.

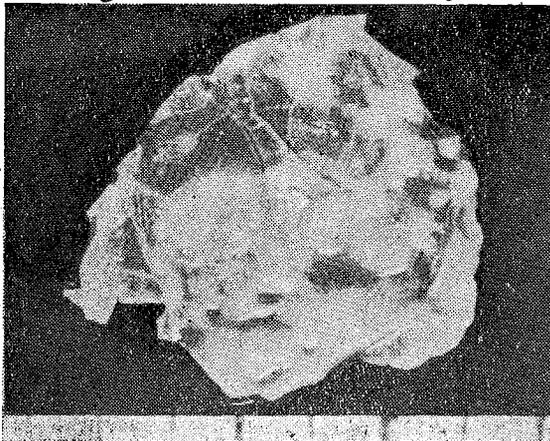
b. Lesiones macroscópicas encontradas en la MCA

La membrana corio-alantoidea en el huevo embriionado de 9 días cubre el embrión, casi todo el saco vitelino y empieza a formarle un saco propio al albumen.

La membrana corio-alantoidea normal, extendida en una caja de Petri, en solución salina y examinada contra un fondo negro es transparente, muy flexible, se mueve con la más mínima corriente, tomando finalmente una apariencia ondulada, opalescente. Los vasos son muy finos y apenas diferenciables.

Membranas de las experiencias en Guayaquil.

Estas MCA presentan nódulos, placas o engrosamientos blanquecinos, de apariencia edematosa, gelatinosa, de variado tamaño y extensión, implantados en una área más o menos opaca, turbia, menos flexible, que puede ocupar desde 5 mm. hasta toda la superficie correspondiente a la cámara de aire, e incluso extenderse más allá, a la parte interior de la misma. En los sitios en que no es visible ningún tipo de lesión macroscópica, la membrana se presenta bastante fina y transparente, de apariencia normal. (Ver fig. 5).



(Figura N° 5)

En algunos casos, el líquido alantoico se presenta turbio, revelando al examen microscópico cierta cantidad de leucocitos y algunos bacilos ácido-resistentes aislados o en pequeños grumos. Esta turbidez se presenta en 21.5% de los 65 embriones que alcanzaron el 6° día después de la inoculación. Se puede apreciar claramente la relación inversa entre la cantidad de bacilos y de leucocitos presentes en frotis realizados con líquidos turbios: los más turbios contienen mayor cantidad de leucocitos y menor cantidad de bacilos. El conteaje se presenta difícil, pero dentro de un criterio convencional se puede expresar según lo indica la tabla IV.

TABLA IV

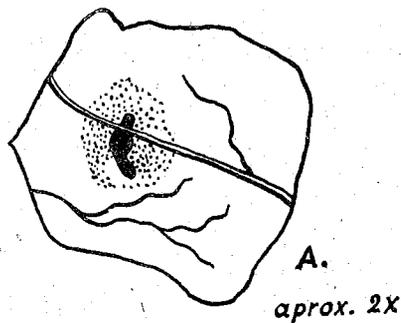
Número relativo de bacilos y leucocitos

Bacilos	Leucocitos	Número de MCA	
		Guayaquil	Quito
++++	+	3	2
+++	++	3	4
++	+++	3	3
+	++++	5	5
0	++++	0	1
		14	15

Hay mucha variación en la apariencia y tamaño de las lesiones, pero se puede sistematizar el tipo de ellas, aunque se la puede distinguir:

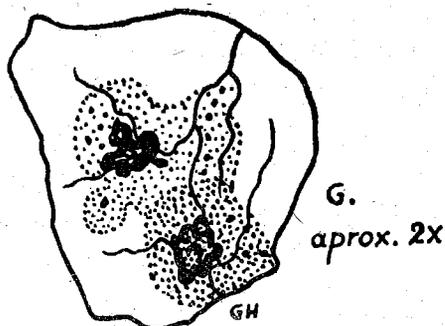
- 1) Un foco solitario a manera de uno, dos o tres nódulos conglomerados, pequeños, blanquecinos, no mayor de 3 mm. de diámetro, implantado en una pequeña

zona de fina opacidad, de alrededor de 5 o 10 mm. de diámetro. (Ver fig. 6).



(Figura N° 6)

2) Varios focos dispersos, a manera de gránulos blanquecinos o de nódulos de variado tamaño, pero menores de 1 mm., centrados por dos o tres focos nodulares más gruesos, hasta de 3 mm., en un fondo finamente opaco (ver fig. 7). La dispersión de estos pequeños focos abarca extensiones desde 1 cm. hasta más de 4 cm. de manera que se extienden más allá de la cámara de



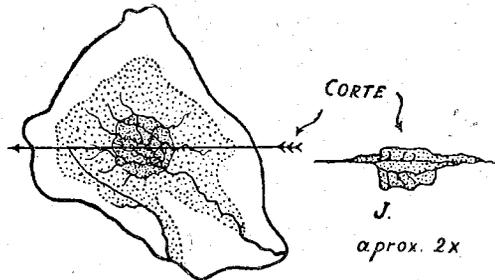
(Figura N° 7)

aire en algunos casos.

3) Gran lesión central a manera de placa irregular y blanquecina, que sobrepasa los 5 mm. de diámetro localizada en una extensa zona muy opaca, con algunos pequeños gránulos blanquecinos dispersos. La lesión gruesa se pronuncia ligeramente hacia afuera, pero se

sumerge bastante en el líquido alantoico (ver figura 8). A veces está rodeada de engrósamientos de apariencia edematosa, gelatinosa, que se sumerge también en este líquido .

La tabla V resume los diversos tipos de lesiones en contradas.



(Figura N° 8)

Las lesiones de tipo 2 y 3, se extienden más allá de la cámara de aire, en un 50% de los casos. En más del 50% del total de lesiones, pero sobre todo en las de tipo 3, aparece una definida tendencia a conglomerarse en la unión de los gruesos vasos. En general, la vascularización aparece grandemente aumentada en las regiones lesionadas, pudiéndose observar finas mallas que tapizan la superficie externa de las lesiones gruesas.

TABLA V

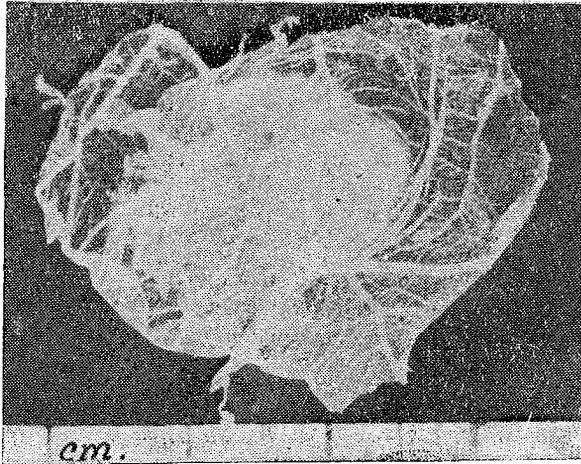
Tipo y extensión de las lesiones

Lesiones	MCA	%
1.—Foca solitario	19	29.2
2.—Focos dispersos	21	38.4
3.—Lesiones gruesas	21	32.4

En algunos casos, se puede observar la presencia de finas bridas de apariencia fibrinosa, que unen la cara interna de la MCA con el saco amniótico y el saco vitelino, especialmente en el sitio de los mesos vasculares más amplios.

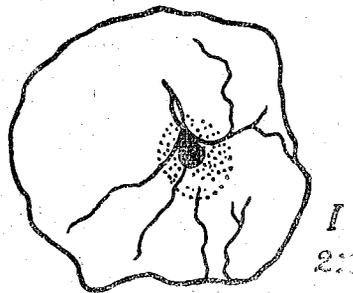
Membranas de las Experiencias en Quito

Macrocópicamente consideradas, las lesiones se presentan como gránulos o nódulos de variado tamaño, de apariencia seca, dispersos o conglomerados, hasta constituir verdaderas formaciones en placa (ver fig. 9). Es posible agrupar los varios tipos de lesiones entre tres grupos más o menos distintos, como en el caso de las membranas de Guayaquil:



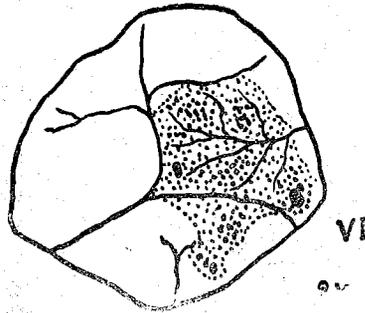
(Figura N° 9)

1.—Un foco solitario, blanquecino, o blanco-amarillento, de carácter granuloso o nodular de bordes nítidos, implantado en una membrana completamente desprovista de otro tipo de lesión. A veces más que un solo gránulo, se trata de dos a cuatro de ellos, conglomerados en un solo sitio, con debilísima opacificación de la membrana circundante. En conjunto, este foco mide de 1 a 3 mm. (ver fig. 10).



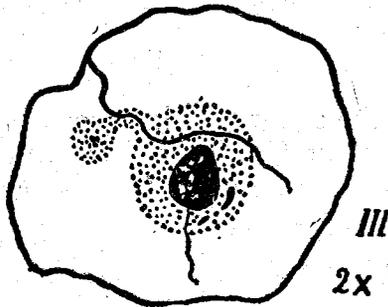
(Fig. N° 10)

2.—Focos dispersos, en gran número, pequeñitos, puntiformes, blanquecinos, centrados por focos más gruesos y confluentes que, pueden alcanzar hasta 3 mm. de diámetro, constituyendo una lesión central gruesa. Estos focos dispersos se implantan en una zona opacada de la membrana, también de contornos nítidos. (Ver fig. 11) pero irregulares. En cuatro casos, en este borde



(Fig. N° 11)

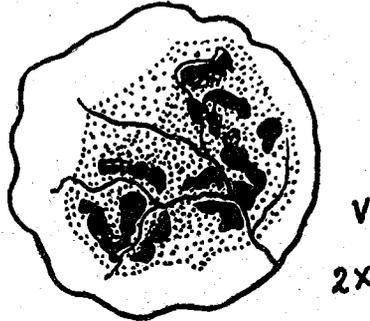
se disponen en hilera unos cuantos gránulos de mayor tamaño, que forman una especie de corona incompleta (Ver fig. 12).



(Fig. N° 12)

3) Membranas con lesiones gruesas, en placa, sólidas, irregulares, blanco-amarillentas, de bordes netos, implantadas en un fondo intensamente opaco que presenta además unos cuantos focos dispersos granulosos. La opacidad o engrosamiento se extiende desde 1 cm. y

tiene también bordes bien definidos. Más allá, la membrana aparece indemne, fina y transparente. (Ver fig. 13)



(Fig. N° 13)

La tabla VI resume estos tipos de lesiones.

TABLA VI

Tipo y extensión de las lesiones

Lesiones	MCA	%
1.—Foco solitario	25	41.0
2.—Focos dispersos	28	45.9
3.—Lesiones gruesas	8	13.1

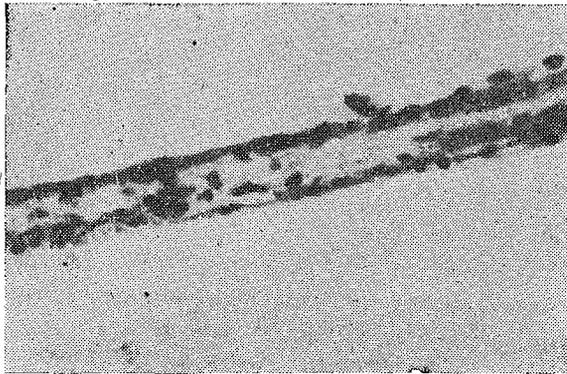
En ningún caso se constató en estas membranas la extensión de las lesiones más allá del borde de la cámara de aire, ni se encontró la presencia de bridas fibrosas, como en los embriones inoculados en Guayaquil. Tampoco se encontraron lesiones de apariencia edematosa, gelatinosas, lo cual quedó comprobado al examinar las secciones histológicas.

En algunos casos, (un 24.6%), el líquido alantoico se presentó turbio, revelando al microscopio, la presencia de cantidades variables de leucocitos y bacilos ácido-resistentes. La intensidad de este fenómeno se describe en la tabla IV. En los casos en que el líquido alantoico se presenta límpido, cristalino, tanto en los embriones

inoculados en Quito como en los inoculados en Guayaquil, no se demuestra la presencia de leucocitos ni de bacilos, en frotis coloreados ni en cultivos. En todo caso, los leucocitos presentes en líquidos turbios, parecen ser fagocitos polinucleares que contienen a veces bacilos intracelulares.

c. Cuadro histológico de la tuberculosis experimental.

La MCA está formada por tres capas: 1.—Una capa epitelial derivada del ectodermo del corión (somatopleura primitiva), constituida por dos hileras de células, excepto en la entrada de capilares y sobre ellos, donde hay una sola hilera. 2.—Una capa mesodérmica resultante de la fusión del mesodermo corionico y mesodermo alantoico, constituida por tejido conjuntivo flojo con mesoblastos poligonales y fusiformes y vasos sanguíneos y linfáticos. 3.—Una capa endodérmica derivada del endodermo alantoico (intestino primitivo), constituida por una sola hilera de células endoteliales (fig. 14).



(Fig. N° 14)

**MEMBRANAS CORIOALANTOIDEAS INOCULADAS A
A 758 mm. Hg. (GUAYAQUIL)**

1.—Reacciones ectodérmicas.

A pequeña ampliación, lo más sobresaliente es el gran espesamiento epitelial, más o menos uniforme en algunas y muy irregular en otras membranas, con par-

tes más gruesas, de apariencia nodular, salientes, y partes tenues, apenas distintas. En algunas zonas en que el espesamiento es notable, se puede ver pequeñas vacuolas rellenas de gruesos paquetes de bacilos que se colorean con la hematoxilina y que demuestran ácido-resistencia con la coloración de Gallego.

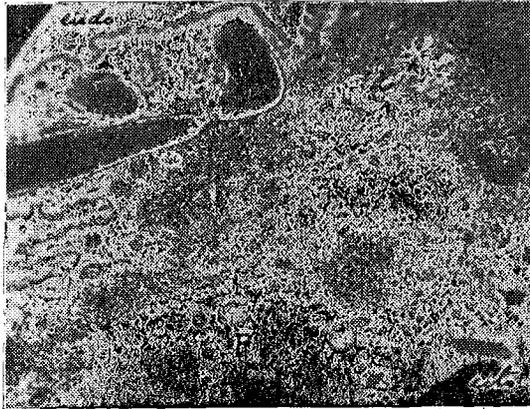
En las membranas en que el espesamiento es poco acentuado, sólo los núcleos regularmente dispuestos en hilera y la regularidad de la disposición celular, permiten identificar el ectodermo.

A mayor ampliación se puede apreciar (en 26% de los casos) infiltración de carácter inflamatorio, que se manifiesta por la presencia de células mononucleares de posible origen hemático (monocitos) y leucocitos de núcleo segmentado, con granulaciones eosinófilas y basófilas. Se puede también apreciar un proceso activo de diapédesis de los capilares, dando la impresión de que los leucocitos salen de los vasos y se inmiscuyen entre las células epiteliales. En algunas zonas, las células epiteliales son poco visibles, pues están invadidas por células fagocitarias del mesodermo.

En las membranas con ectodermo hipertrófico, se aprecian desde dos hasta más de seis capas o hileras celulares, dispuestas de manera que semejan un epitelio escamoso poliestratificado. En muchos casos, esta hiperplasia está acompañada de una aparente keratinización o cornificación de las hileras más superficiales, que se vuelven descamantes o se desprenden en pequeños bloques. Estas formaciones, a pequeña ampliación, se presentan muy densas. Las células keratinizadas son más aplanadas mientras más superficiales, muy acidófilas, con núcleo pequeño, muy denso, bien coloreable, mientras el resto de células mantienen su protoplasma algo poligonal, con núcleo más grande y menos denso, con escasa cromatina.

En un gran número de membranas, (57%) se presentan grupos de células similares a las ectodérmicas, a manera de islotes, las llamadas así "perlas", caracterizadas en el centro, por células poligonales de núcleo redondeado y grande, y en la periferia, por células apla-

nadas, dispuestas en coronas concéntricas, con núcleo denso. Para la mayoría de los autores, estas perlas serían una manifestación secundaria a la proliferación epitelial de carácter nodular: serían porciones ectodémicas invaginadas y separadas artificialmente por la dirección del corte. Excepcionalmente, he podido ver una conexión con el resto del ectodermo, pues se presentan aisladas, profundamente enclavadas en el mesodermo. El número y el tamaño de estos islotes ectodérmicos es variable, y no he observado bacilos en su interior. Alrededor de ellos, no se encuentra reacción mesodérmica. El hecho de que en muchos casos se pueden observar las "perlas" adheridas o apenas desprendiéndose del ectodermo, me induce a creer que no se trata de invaginaciones (en cuyo caso se podría descubrir un pedículo en cortes seriados), sino más bien de verdaderas migraciones de bloques celulares que se van separando hasta constituirse en grupos independientes (fig. 15).



(Fig. N° 15)

Ectodermo desprendido, endodermo plegado, invaginado. Perlas ectodérmicas, P. Tubérculo joven. Edema mesodérm. 80x.

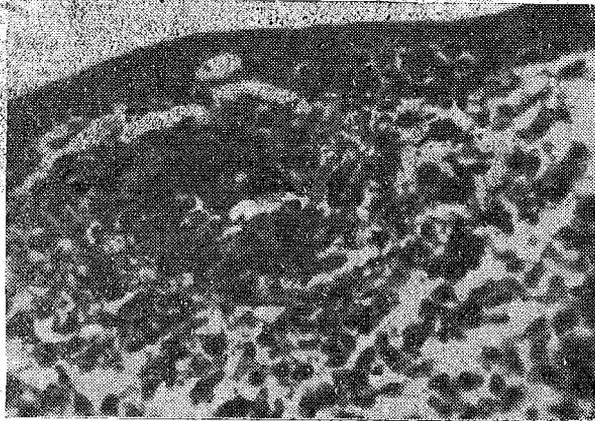
Los bacilos del inóculo implantados sobre la membrana, han corrido suertes diferentes. En los casos en que se acumulan en gran cantidad sobre el epitelio ectodérmico o se encuentran incluidos en sus células, su número es escaso en el mesodermo, y difícilmente se apre-

cian grumos a pequeña ampliación. En la mayoría de casos, la invasión y la proliferación son tan grandes que se puede descubrir grumitos a diferentes profundidades del mesodermo, precisamente en las zonas que presentan mayor respuesta celular.

Lo más frecuente es encontrar, en el ectodermo, los bacilos intracelulares, en células epiteliales de morfología edematosa o vacuolizada, o fagocitados por mononucleares que emigran hacia el interior del mesodermo. Estos fagocitos son frecuentemente de difícil diferenciación de las mismas células epiteliales modificadas. Intracelulares, los bacilos forman grumos de algunos elementos, como bastoncitos uniformes, dispuestos en densa palizada. En las membranas que presentan keratinización, se ven gruesos paquetes de bacilos poco diferenciados, que ocupan verdaderas vacuolas entre las células ectodérmicas. Los pequeños grumos, excepcionalmente se encuentran en las capas más superficiales, mientras los paquetes lo están siempre. Se puede ver también sobre la superficie ectodérmica, grandes acumulos de bacilos a manera de microcolonias, en que cada elemento conserva su individualidad. En raras ocasiones, están infiltrados por escaso número de células de origen sanguíneo.

La formación de lo que podría considerarse tubérculo, se inicia inmediatamente debajo de la superficie del ectodermo, (Ver fig. 16) en cuyo caso, a pequeña am-

Tubérculo joven, superficial. Ectodermo hiperplásico. Monocitos, fibrosos. Formación de cél. de Langhans. 600x.

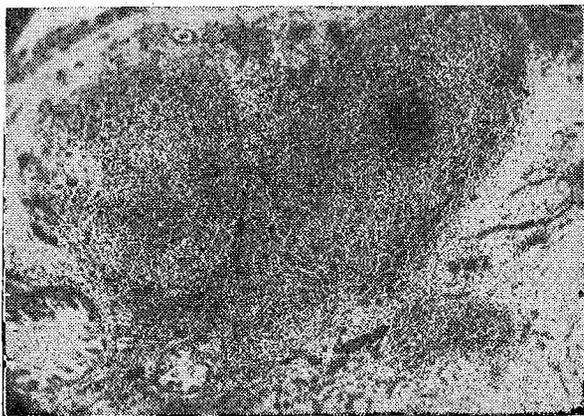


(Fig. Nº 16)

pliación se ve una solución de continuidad en la parte basal del mismo y se puede seguir la migración de grupos celulares diferenciados y la confluencia de células mesenquimales hacia dicho foco. Las capas más profundas ectodérmimas están desordenadas, se aprecia el desprendimiento de células basales. Con gran ampliación, es fácil seguir el proceso invasor del mesodermo por bacilos fagocitados o por bacilos que migran a través de un ectodermo poco proliferado. Existe un proceso metaplásico, y se puede ver que las células que se desprenden del ectodermo van tomando caracteres de células mononucleares, grandes, algo irregulares, o de verdaderas células poligonales del meséquima.

2—Reacción mesodérmicas.

Los nódulos del examen macroscópico, en el corte y a pequeña ampliación se presentan, como conglomerados redondeados de focos con una estructura característica y cargados de gran cantidad de grumos de bacilos dispersos, dentro de ciertos límites. (Ver figs. 17, 18)

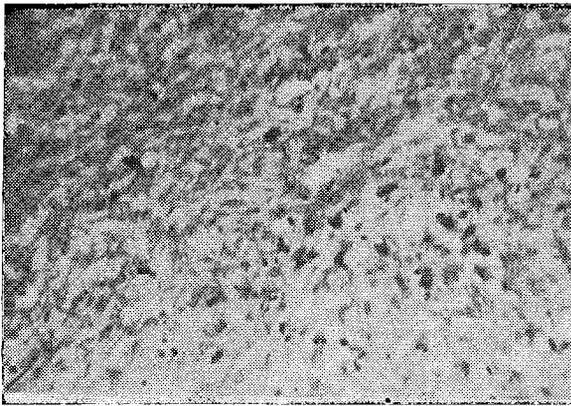


(Fig. N° 17)

Tubérculo con necrosis central, que recuerda formación de cavernas "sin pared propia", de tuberculosis exudativa. 80x.

Estos focos adoptan una disposición tal que carac-

teriza el tipo de respuesta en este grupo de membranas. La parte central está constituida por un tejido en que tanto las células que intervienen en su constitución, como su disposición es polimorfa. A gran ampliación se puede observar que está constituida por elementos característicos del tubérculo. El conglomerado celular multiforme consiste de elementos redondeados mononucleares, de células epitelioides y de células alargadas poligonales, de origen mesenquimal, agrupadas sin una orientación definida y desordenadas. Las células mononucleares tienen protoplasma escaso y débilmente eosinófilo y núcleo redondeado u ovalado pobre en cromatina, bien definido y poco coloreado. Entre estas células se disponen finos capilares a través de cuyas paredes delgadas se manifiesta un proceso de migración leucocitaria. Esta parte central tiene una gran cantidad de grumos ácido-resistentes que resaltan, dispersos uniformemente. (Ver fig. 18).



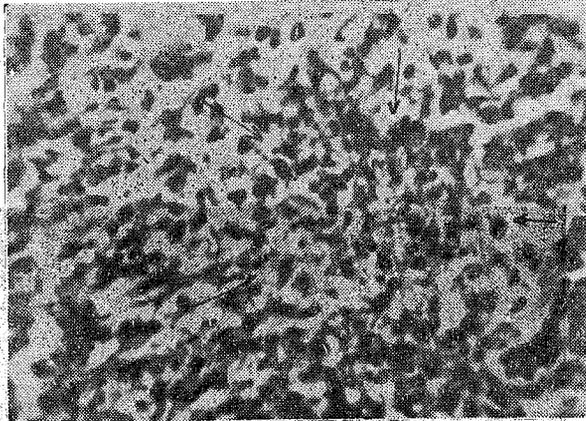
(Figura N° 18)

Bacilos aislados y en grumos, en forma dispersa uniformemente en la masa de tejido tuberculoso. 600x.

En algunas membranas, en que la reacción es muy intensa con enorme respuesta celular, se puede apreciar a pequeña ampliación la zona central de la lesión con una apariencia amorfa, resquebrajada en que se puede distinguir, a mayor ampliación, gran cantidad de peque-

ños núcleos agrupados en forma desordenada y apretada, en un fondo intensamente eosinófilo, dando la apariencia de verdaderos centros necróticos; en estos casos es evidente la presencia de células gigantes perifocales. (Ver figura 17).

La lesión central en 36% de casos es un tubérculo bien desarrollado (ver figs. 19, y 21), constituido por células gigantes, que son típicos sincicios con más de cinco núcleos dispuestos en corona, en un protoplasma bastante acidófilo, y por células epitelioides, grandes, de protoplasmas irregulares, de grueso núcleo redondeado u ovalado, pálido. Estas células se agrupan en racimos

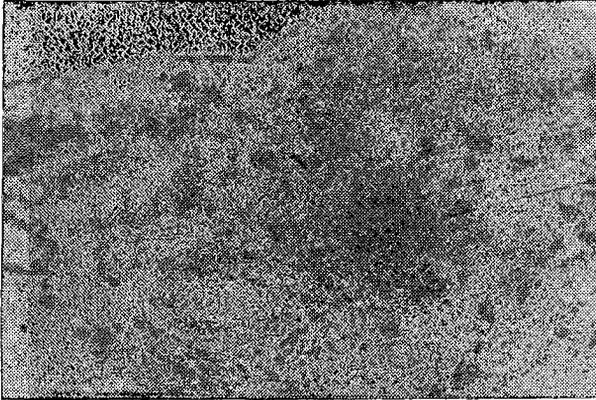


(Fig. N° 19)

Centro de un tubérculo de carácter "blando", en que se inicia necrosis y fragmentación de núcleos de mononucleares, y formación de células de Langhans. Cél. mesenquimales. 600x.
(Comparar con fig. 5 de Rich, A. "Path. of Tuberc.").

(74% de casos) de pocos elementos, que casi siempre engolfan gran número de bacilos dispuestos en grumos o aislados sean intracelulares o no. Alrededor de estas agrupaciones celulares hay algunos monocitos y pequeñas células redondas de aspecto linfóide. Las células fibroblásticas se disponen también en la periferia, pero en escaso número y sin una disposición especial. Los mononucleares presentan muchas formas de mitosis, sobre todo en los sitios en que se agrupan en racimos.

En los focos de mayor reacción, la vascularización es muy abundante. Los capilares que penetran al centro



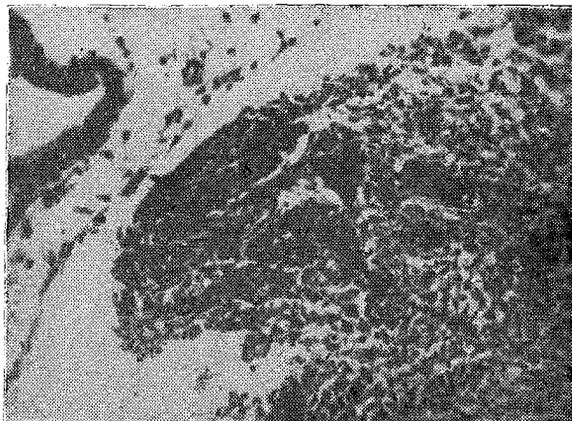
(Figura N° 20)

Grandes agrupaciones de monocitos, y gran infiltración mesodérmica de polinucleares. (Respuesta celular III). 60x.

de la lesión presentan sus paredes rotas, habiendo entonces pequeñas hemorragias que aparentemente son el origen de los centros necróticos. La necrosis franca se presenta en 22.4% de las membranas y en un solo caso se encuentra franca caseosis. Estos centros amorfos, presentan gran cantidad de núcleos celulares degenerados, fraccionados, sobre todo de leucocitos y de hematíes.

Este foco amorfo necrótico, está rodeado por algunas células gigantes. En el caso en que se manifiesta caseosis, se trata de un centro también amorfo en que no se puede distinguir sino pequeños gránulos basófilos, restos de núcleos, y una masa acidófila, refringente. Está también rodeado de células gigantes en escaso número, y de gran reacción celular en el resto del mesodermo. Entre las células gigantes, tanto en las lesiones necróticas como en las caseosas, hay gran cantidad de células epitelioides dispuestas en corona, pequeñas células mononucleares, linfoides, monocitos y raros "eosinófilos", células mesenquimales, sucesivamente más alejadas de

la porción central y constituyendo una gran porción de todo el mesodermo hipertrófico. (Ver figs. 20, 21).



(Figura N° 21)

Ectodermo keratinizado. Edema mesodérmico. Células gigantes de Langhans, que engolfan bacilos. 200x.

La lesión central está rodeada por un tejido que a pequeña ampliación, se presenta más flojo, reticulado, en que se hacen particularmente numerosos los capilares, de contenido denso, cargados de hematíes. Desde este tejido, se puede seguir capilares más finos que se adentran en la parte central de la lesión. En general, la vascularización está aumentada en todo el mesodermo. La migración de células sanguíneas es muy activa, sobre todo en las lesiones gruesas, de modo que se puede ver los vasos cargados de hematíes y con escaso número de leucocitos. En vez, alrededor de los vasos, se puede ver gran cantidad de células agrupadas en racimos más o menos densos y uniformes: son mononucleares con núcleos redondeados, grandes y bien coloreados, y polimorfonucleares, especialmente cargados de gruesas granulaciones acidófilas, de manera que parecen verdaderos eosinófilos. Estos grupos celulares uniformes se disponen alejados de la lesión central; son racimos que se suceden

en algunos casos sin dejar una solución de continuidad con los tubérculos, mientras en otras ocasiones están perfectamente aislados, separados de los mismos, por un tejido más bien flojo, edematoso o vacuolado, con débil infiltración. Lo más frecuente es encontrar los racimos celulares de mononucleares rodeando a los capilares, pero también se encuentran, rodeando a pequeños grumos ácido-resistentes, en cuyo caso también se hace presente otro tipo de células.

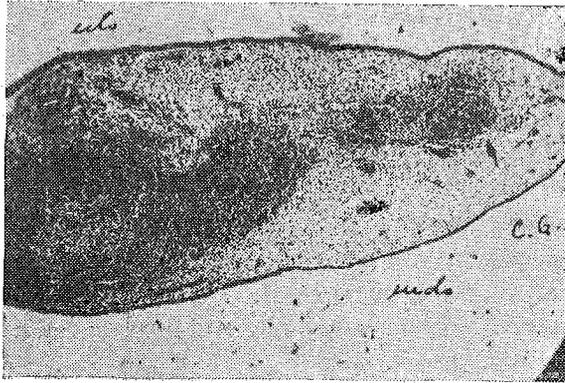
Es de particular interés la presencia de leucocitos polimorfonucleares con granulaciones acidófilas, que pueden confundirse fácilmente con verdaderos eosinófilos. Según Canat y Opie, (81), se trata de células polimorfonucleares jóvenes. He observado que estos "eosinófilos" se encuentran en gran número sobre todo alrededor de los vasos, formando racimos. Excepcionalmente forman una corona al "tejido de granulación tuberculosos" y más raramente se entremezclan con sus células. Entre las células que rodean al tubérculo se encuentran también células plasmáticas, (plasmazellen).

Entre los racimos de "eosinófilos" y sus vecindades, en estas membranas no se encuentran en ningún caso bacilos; además, en la mayoría de casos, no se encuentra otra respuesta celular mesodérmica que los rodee, solamente tejido flojo edematoso, con unas cuantas células mesenquimales poligonales.

La presencia de gran número de mitosis entre las células mononucleares, parece indicar que la mayor respuesta celular está dada por proliferación local y formación de células en el mismo sitio de reacción, en mayor intensidad que por células migratorias de origen hemático. La enorme cantidad de tejido formado se debe aparentemente a gran proliferación y diferenciación activa de las células mesenquimales.

En los casos en que el edema es sumamente grande, hay sólo ligera infiltración, de manera que el "tejido tu-

berculoso" está como confinado a solamente una parte del mesodermo. (Ver fig.22).



(Figura N° 22)

Gran edema mesodérmico y reacción de mediana intensidad, que se separan nitidamente. Tubérculo joven y tubérculo bien desarrollado, ambos de tipo "exudativo". En el mayor, hay tendencia a necrosis. Gran vascularización.

Es posible deducir en el proceso de invasión y formación de lesiones en el mesodermo, y sistematizar dicho proceso:

1) — Los bacilos, a partir del ectodermo, invaden el mesodermo activa o pasivamente. En el primer caso, hay multiplicación de los bacilos extra celulares, que se presentan agrupados en grumos o paquetes. En el segundo caso, los bacilos son fagocitados por células ectodérmicas diferenciadas, que avanzan hacia el centro. La multiplicación de los bacilos continúa, las células se edematizan y estallan liberando bacilos aislados o en grumitos de escasos elementos. Esta destrucción de fagocitos puede hacerse a diferentes profundidades del mesodermo, de manera que hay la posibilidad de ulterior formación de varios focos, más o menos superficiales, en diferentes estados de desarrollo.

2) — La presencia de un número suficiente de bacilos da lugar a formación de células mononucleares y a infiltración de carácter inflamatorio. La formación precoz de un tubérculo está indicada por la presencia de pe-

queños conglomerados de células mononucleares de apariencia epitelial y monocitos, que es la respuesta específica a uno de los constituyentes lipídicos del bacilo. Seguidamente, hay reacción mesenquimal y la presencia de fibroblastos es su manifestación.

3) —Hay, paralelamente, neoformación de capilares, como respuesta específica a la presencia de un germen capaz de provocar reacción inflamatoria. La necrosis posterior es seguramente un fenómeno tóxico vascular, ocurriendo en primer término ruptura de capilares con hemorragia, y luego atracción de granulocitos que sufren degeneración de inmediato.

4) —La presencia de células gigantes no corresponde a la presencia de tejido necrosado ni de caseosis. Estas células son de tipo Langhans, formadas por fusión de protoplasmas de células mononucleares, y no de tipo de células gigantes a cuerpo extraño, formadas frente a la presencia de materiales inertes o de desecho celulares. Efectivamente, su morfología las identifica como células de Langhans: núcleos ovalados, densos, dispuestos en corona, basófilos, bien coloreados, con una tenue malla bien distinta; protoplasma acidófilo, de contornos irregulares; en ciertos casos, se puede apreciar la estructura lobulada, en roseta, del citoplasma.

En las membranas en que la edematización es intensa, se descubre la presencia de células de apariencia de degeneración mucoide, con protoplasma vacuolado, irregular y muy pálido, edematoso y un núcleo ovalado, algo más coloreado, grande, con cariosoma exéntrico. Estas células, cuyo origen se hace difícil determinar, se encuentran particularmente en zonas en que el mesodermo se presenta vacuolado, con muy escasa infiltración; parecen células mesenquimales que han sufrido una degeneración de carácter tóxico.

Entre las membranas inoculadas en Guayaquil, se encuentran unas pocas (10%) con gran reacción fibrosa que parte del ectodermo mismo, forma verdaderas mallas gruesas, internándose en el mesodermo. En estos casos, la respuesta celular característica no se manifiesta, o está representada solamente por pequeñas agrupa-

ciones de células mononucleares. Los bacilos, en estos casos, se encuentran en el espesor mismo de las mallas fibrosas, siempre intracelulares, pero en gran número, engolfados por células mononucleares, junto a las mismas mallas. En estas membranas, es posible ver zonas de apariencia hialina, en que hay raras células mesenquimales. Esta apariencia de hialinización se presenta también en otras membranas en que la respuesta es predominantemente fibroblástica. La vascularización es abundante, y se puede observar las paredes de los vasos engrosadas y rodeadas también de tejido conectival, con franca tendencia a fibrosis.

3.—Reacciones endodérmicas.

Al contrario de lo que comunican los diversos autores, es sumamente raro que esta capa de la MCA esté absolutamente indemne. La reacción es escasa, pero constante en 71 % de casos. Hay hiperplasia con aumento del número de capas celulares. En muchos casos hay invaginaciones, pero no se encuentran islotes celulares del tipo "perlas". Es frecuente la formación de papilas de células de apariencia glandular, de forma poligonal, con finas granulaciones, con núcleo basal y aplanado en sentido transversal. A veces, presentan verdaderas vacuolas en el citoplasma.

MEMBRANAS CORIOALANTOIDEAS INOCULADAS A 547.7 mm.Hg (QUITO)

1.—Reacciones ectodérmicas.

También en este grupo de membranas, como en las inoculadas a nivel del mar (Guayaquil), se puede apreciar a pequeña ampliación, zonas de espesamiento y zonas de infiltración. Pero la intensidad de la reacción es notoriamente menor, de manera que, los gruesos ectodermos, de apariencia muy densa, sólida, con formaciones nodulares marginales, son bastante raros. Los epitelios engrosados y con escasa keratinización y cornificación, son más frecuentes.

Los caracteres celulares son similares a los ya des-

critos para esas membranas. Es decir, aparentemente, la respuesta desde el punto de vista cualitativo, corresponde enteramente a las observadas en dichas membranas, siendo en todo caso, la intensidad y la extensión menores. En algunos casos, sólo hay hipertrofia ectodérmica frente a la zona de reacción del mesodermo, encontrándose el resto del epitelio más o menos indemne. Hay algunos casos (20.7%) de engrosamiento nodulares, y se puede descubrir la presencia de las llamadas "perlas ectodérmicas", en menor número y casi siempre constituidas por células de apariencia poligonal, de núcleos pálidos, apenas visibles, sólo en el centro de las perlas presentes en las membranas de Guayaquil. En dos casos he observado bacilos en el corazón de las "perlas". La disposición en varias capas concéntricas es poco definida. Es indudable que esta estructura corresponde fielmente a la escasa cornificación epitelial.

Los focos ectodérmicos de carácter inflamatorio, presentan una estructura igual a los focos análogos descritos en las membranas de Guayaquil, aunque el número relativo de leucocitos con granulaciones acidófilas es seguramente mayor.

Los bacilos del inóculo se encuentran sobre el epitelio ectodérmico, formando grandes acumulos superficiales, o se encuentran en el espesor del mismo, fagocitados por células poligonales vacuolizadas. Frecuentemente, se ven éstas células desprendiéndose del ectodermo, para adentrarse en el mesodermo. Es poco frecuente encontrar paquetes de bacilos incluidos en las células epiteliales, y más bien se encuentran formando pequeños grumos en que los elementos bacterianos son bien diferenciados entre sí.

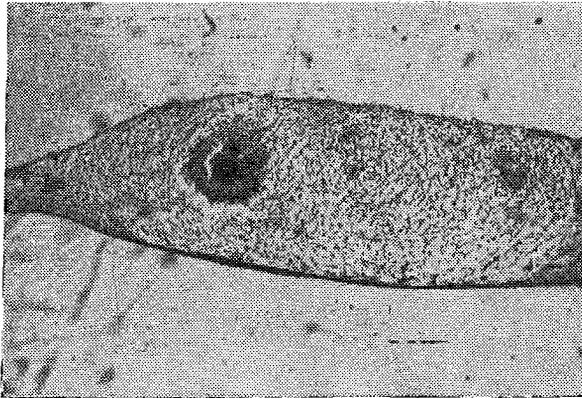
En los casos en que macroscópicamente se pueden observar gran número de focos dispersos, se puede ver en el corte, y a pequeña ampliación, una disposición desordenada de las células ectodérmicas, que justamente coincide con focos marginales de reacción mesodérmica. Se puede seguir el proceso de invasión de células ectodérmicas hacia la capa media, con diferenciación inmediata.

Algunas membranas presentan una reacción ectodérmica que no podría ser diferenciada de las membranas de Guayaquil, si no fuera porque paralelamente se encuentran las zonas de reacción mesodérmica, cuyo carácter es bien distinto.

2.—Reacciones mesodérmicas.

Son más importantes, desde luego, que las ectodérmicas. Si bien en muchos casos sería imposible separar los pequeños focos tuberculosos de focos igualmente pequeños que se encuentran en las membranas de Guayaquil, en general, la distinción es fácil y las diferencias resaltan nítidamente.

En estas membranas es más notoria la correspondencia entre el cuadro macroscópico y el cuadro histológico. Así, los nodulos solitarios, están constituidos por una sola lesión con un centro amorfo, rodeado de células sinciciales, y de tejido francamente fibroso. A pequeña ampliación, fuera de esta imagen, no se encuentra ningún otro tipo de agrupación celular, a veces, gran infiltración alrededor de gruesos vasos. (Fig. 23).

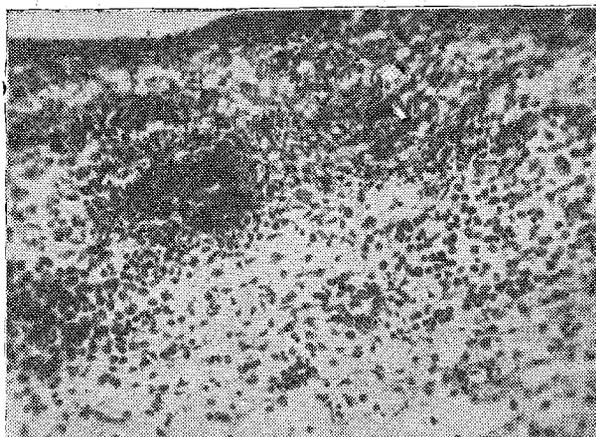


(Figura N° 23)

Tubérculo joven con necrosis central rodeada por células gigantes y malla de tejido conjuntivo flojo, sin otra respuesta celular inflamatoria. 60x.

Las membranas que presentan gran número de nódulos o focos granulados dispersos, están constituidos por gran número de pequeños focos celulares cuyo centro de-

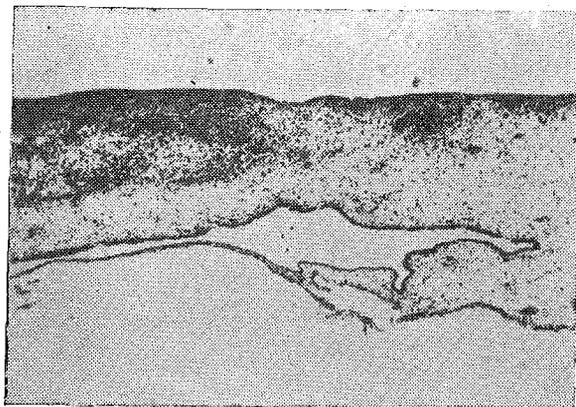
muestra una estructura necrótica, con escasa reacción celular circundante, y sobre todo caracterizada por tejido dispuesto con cierta orientación definida, que a mayores ampliaciones se revela formado por células fibro-cíticas. (Figs. 25, y 26).



(Figura N° 25)

**Microtubérculos superficiales con necrosis y engolfando bacilos.
Infiltración por eosinófilos. 200x.**

Las gruesas lesiones en estas membranas están constituidas por varios focos de carácter destructivo, que confluyen, demostrando las porciones centrales sin

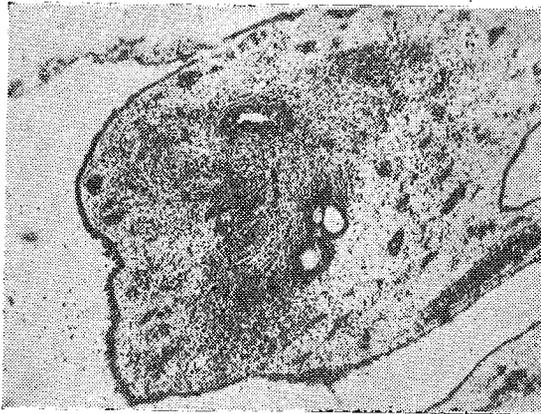


Jóvenes tubérculos superficiales sufriendo precozmente fibrosis: nótese la disposición del tejido conjuntivo. (La misma membrana de la fig. 25). 60x.

(Figura N° 26)

ninguna estructura, rodeadas por células gigantes, y también por tejido fibrótico. En estos casos, la reacción celular en el resto del mesodermo ya es de bastante intensidad, pero en ningún caso iguala a la producida en las membranas inoculadas en Guayaquil. En pocos casos, hay también mesodermos edematosos, con infiltración celular muy discreta. (Figs. 27, y 28).

En las membranas inoculadas en Quito, predominan las lesiones de carácter necrótico, (40.7%) relativamente a otros tipos de lesiones. En 10 casos (19.5%) hay franca caseosis, y algunos de éstos parece manifestarse lo que sería un reblandecimiento caseoso, de carácter amorfo, sin núcleos, ni restos de células, muy refringente. En las lesiones necróticas, se ve, a pequeña ampliación, una masa central redondeada, de bordes festoneados, amorfa, fuertemente coloreada por la eosina, rodeada de agrupaciones celulares con núcleos intensamente coloreados y amontonados, y luego, de un tejido flojo en que la disposición de células alargadas, estrelladas, es distintamente circular u ondulada (fig. 27). Le-

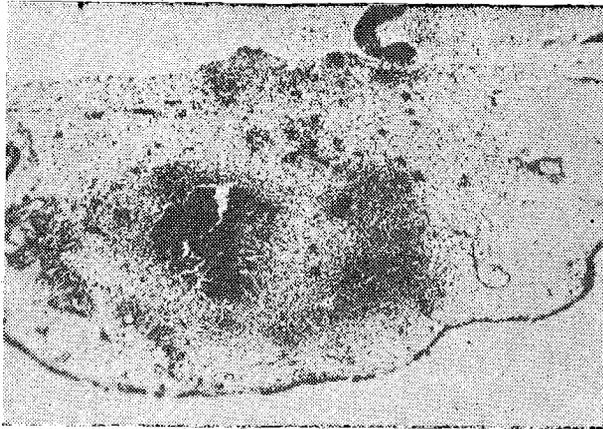


(Figura N° 27)

Pequeños racimos de células mononucleares rodeadas por tejido conjuntivo dispuesto en haces arremolinados. 60x.

jos de estas lesiones, se ven pequeñas agrupaciones de otros focos celulares de apariencia uniforme, más densa,

en que predominan los gruesos núcleos. A mayor ampliación, se puede ver la acumulación de núcleos destruidos, degenerados, sobre una masa amorfa, fuertemente eosinófila. En la parte más periférica de estos grumos necróticos, esta masa amorfa está desprovista de restos nucleares, se hace muy refringente, se pone en contacto directo con células gigantes.

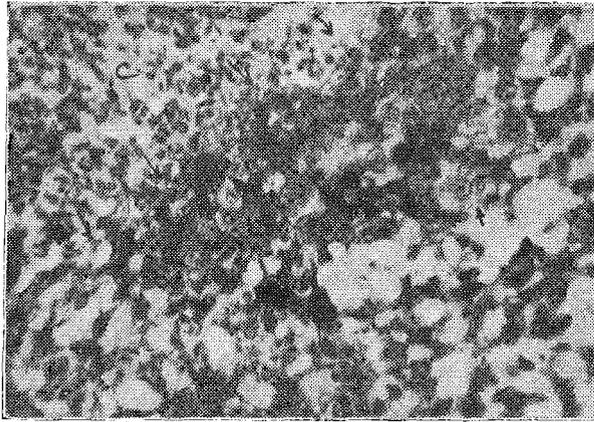


(Figura N° 28)

Gran tubérculo con caseosis central, rodeada por células gigantes y mediana infiltración celular de origen vascular.

Las células gigantes en estas membranas, pueden diferenciarse sin dificultad en dos grupos: las primeras, están constituidas por protoplasmas escasos, con gran cantidad de núcleos distribuidos en el centro, en forma irregular; son núcleos densos y muy coloreados. Estas células están en contacto inmediato con la masa necrótica periférica, y parecen formadas por la conjunción de varias células de carácter epitelioides. Se distribuyen en gran número, sin ponerse en contacto unas con otras, separadas, por células de apariencia epitelial, que completan una barrera limitante de lo que podría considerarse como masa caseosa.

Estas células de apariencia epitelial son grandes, de núcleo, también grande, redondeado, pálido. Las otras células gigantes, de tipo Langhans, se encuentran más bien distribuidas en zonas de reacción celular en que no hay necrosis: lo más frecuente es que se encuentren rodeando a bacilos, engolfándolos, o fagocitándolos, juntamente con otras células. Estas células gigantes tienen menor tamaño, menor número de núcleos dispuestos casi siempre en semicírculo. El protoplasma presenta granulaciones. (Fig. 29).



(Figura N° 29)

En C, centro de tubérculo necrótico, rodeado de células gigantes y "epitelioides", que forman anillo. 500x.

Más allá de las células gigantes y epitelioides, que rodean a la masa necrótica, se encuentran pocas células redondas, pequeñas, de núcleos densos (linfoides) y leucocitos polimorfonucleares con gran número de gruesas granulaciones acidófilas. Entre éstas células, y más allá llenando el resto del mesodermo lesionado se encuentran células poligonales mesenquimales, predominantemente fibrocitos con sus características bien definidas. Estas células se disponen orientadas en sentido circular a la lesión central.

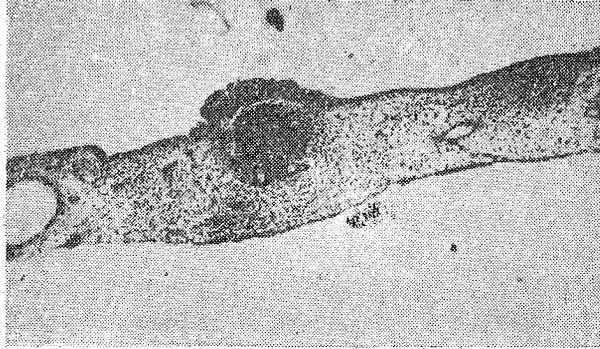
Las agrupaciones celulares aisladas, de éstas lesio-

nes de carácter necrótico, están constituídas por células mononucleares y granulocíticas que forman verdaderos racimos, sobre todo al rededor de los vasos. Pero, la imagen no es uniforme y siempre es posible ver gran número de células fibroblásticas y fibrocíticas. Al contrario de lo que se observa con bastante constancia en las membranas de Guayaquil, se encuentran entre éstas células muchos bacilos dispersos, aislados o en pequeños grumitos.

Cuando la lesión principal no es necrótica, en todo caso, la respuesta celular es mucho menor que la observada en las membranas de Guayaquil. Está constiuída por pocas células gigantes, del tipo descrito como "células de Langhans" más arriba por unas cuantas células de apariencia epitelial, por mononucleares más densos y pequeños, por células de apariencia linfoide, unos cuantos eosinófilos y, característicamente por bastantes células fusiformes, de núcleo denso, que le dan una particular apariencia de tejido arremolinado, con haces orientados. En muchos casos en estos "tubérculos" parece evidente la iniciación de necrosis por la ruptura de capilares sanguíneos y la producción de pequeñas hemorragias localizadas. Esta necrosis se hace evidente en forma precoz, en "tubérculos" pequeñitos, superficiales, sin mayor reacción mesodérmica restante. Es también precoz la aparición de tejido con tendencia a formar haces fibrosos.

En estas membranas es más difícil establecer el proceso de formación de las lesiones, al menos en lo que se refiere a los "tubérculos" con centro necrótico, puesto que no se encuentra ningún otro tipo de respuesta circundante. Parece que las células que acarrean los bacilos desde el ectodermo, sufrirían un proceso de destrucción precoz, sin la presencia de mayor respuesta mesodérmica, siendo inmediatamente envueltas por un tejido que impide una evolución posterior. Las células gigantes que rodean a estos centros necróticos se encuentran raramente fagocitando bacilos y estos más bien se disponen entre las células epitelioides, de manera que no se distribuyen ampliamente en el mesodermo lesionado. Es de-

cir, parece que la invasión y la dispersión en el mesodermo, están bastante limitadas. (Fig. 24).



(Figura N° 24)

Tubérculo joven, superficial, subcutáneo, con necrosis y fibrosis precoz. 60x.

En muchos casos, es fácilmente observable la necrosis de las células gigantes tipo Langhans, con formación inmediata de células gigantes a cuerpo extraño, es decir, de aquellas con gran cantidad de núcleos dispersos. Es posible suponer que el crecimiento del centro necrótico sigue una evolución centrífuga, a expensas de células de Langhans y de células epitelioides que lo rodean. Cuando la necrosis es franca, las células gigantes que rodean la lesión parecen más bien formadas frente a la presencia de tejido destruido.

La evolución de los "tubérculos" sin necrosis, manifiestan a la fecha de fijación de las membranas, puede seguir el mismo camino que en las membranas de Guayaquil, aunque hay que anotar el hecho interesante de la presencia de leucocitos "eosinófilos" en el tubérculo mismo, y la existencia, no en caso muy raros, de células gigantes rodeadas de escasísima respuesta celular de otro tipo.

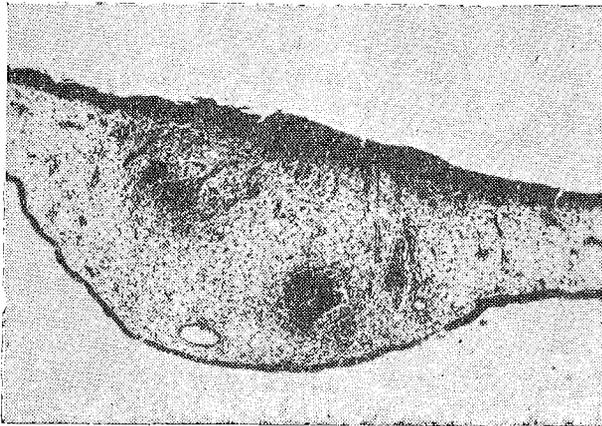
La disposición de los bacilos en el mesodermo, toma caracteres especiales: se ven confinados o engolfados a regiones bien definidas, limitadas por tejido mesenquimal, casi siempre de carácter fibroso. En muchas

de las zonas invadidas por bacilos, no hay formación de tubérculo necrótico, solamente la presencia de células mononucleares y "eosinófilos". Los bacilos engolfados se encuentran intracelulares en agrupaciones de pocos elementos. No se encuentran en ningún caso grumos o paquetes gruesos, libres en el mesodermo. No es posible establecer una idea bien clara sobre la cantidad de bacilos presentes, pero en conjunto, el mesodermo de las membranas inoculadas en Quito, está menos cargado de bacilos que de las membranas inoculadas en Guayaquil.

En los casos en que hay edema mesodérmico notable (4%), se puede descubrir la presencia de células "mucoides".

d.—Controles.

En las membranas inyectadas con solución salina fisiológica, he podido descubrir una ligera hipertrofia del epitelio ectodérmico, de carácter muy circunscrito, seguramente correspondiente al sitio de traumatización por la aguja. Por debajo del epitelio hipertrófico, se puede ver una afluencia de monocitos y proliferación fibroblástica, también muy circunscritas y de carácter microscópico. La membrana, macroscópicamente, no presenta sino un granulito puntiforme, apenas diferenciable, so-



(Figura Nº 30)

Dos pequeños tubérculos con necrosis y fibrosis precoz.

bre una pequeña zona ligeramente engrosada. No he podido encontrar diferencias entre las membranas tratadas en Guayaquil y las tratadas en Quito, sólo con CLNa al 8.5 por mil.

Con la cepa BCG, no he logrado una implantación de bacilos, en las MCA. se aprecia, al corte, ligera proliferación del ectodermo y afluencia de monocitos al sitio de inoculación.

En la gran mayoría de membranas consideradas en esta investigación, el tiempo límite impuesto, desde la inoculación hasta la fijación, seis días, es suficiente para poder apreciar las diferencias en el cuadro histopatológico producido. En cortes realizados en membranas retiradas antes de los seis días de incubación experimental se puede seguir paso a paso la formación de los tubérculos, distinguiéndose ya a las 24 horas la presencia de elementos celulares característicos, formando jóvenes tubérculos cuya diferenciación en ambos grupos de membranas puede ser hecho precozmente, por la predominancia de células mononucleares en las inoculadas a 758 mmHg. y de leucocitos eosinófilos y fibroblastos en las membranas inoculadas a 547 mm.

Los cortes efectuados en hígados y vasos de varios de los embriones inoculados, no revelaron la presencia de bacilos ácido-resistentes ni de lesiones de apariencia tuberculosa.

Las inoculaciones efectuadas en cobayos pusieron de manifiesto el grado de virulencia de la cepa empleada, la H37Rv. En Quito, de cuatro animales inoculados, dos presentaron caseosis en el sitio de la inyección (muslo) y caeosis ganglionar de los grupos epigástricos e ilíacos correspondientes. Los otros dos presentaron una tuberculosis generalizada. La supervivencia de los animales fué de 60 a 100 días.

Los cobayos inoculados en Guayaquil, murieron a los 20 días de la inoculación, pero no se pudo obtener datos detallados del cuadro patológico desarrollado.

CUADRO 1

COLOS HISTOLOGICOS

RESUMEN DE PROTO

MCA Inoculadas a 758 mm. Hg—GUAYAQUIL

		ECTODERMO					ENDODERMO			MESODERMO	
1 N°	2 Proliferc.	3 Ker Cor	4 Ad	5 Perlas—Sp	6 Perlas—CC	7 Infl. Infm.	8 Bacil distr	9 Prolif.	10 Invg papl	11 Edema	12 Respst. celular
1—	III	K		++	2		F:gs	II	IIIP	III	IID
2—	II	cn		+++	2—4		FP	I	I	IV	IIC
3—	II	K				++		I	I	II	IID.p
4—	III	K				++	F:gs	II	P	I	IIDCp
5—						+				II	
6—	II	K		+	2		FP	I		II	IID
7—				++	2—3					II	ID
8—	III	K	+		2—4		FPm	II	I	II	IIIC
9—	I		+	+	2			I	P	II	+
10—	II	cn					F:g	I		I	IIIC
11—	II			++	3—4		F:g	I	I	I	IIIDC
12—	II	Kn				++	F:gP			I	I
13—	III	K	++		1—2	+	FgPm	I	IP	III	ID
14—	II	K		+++	2—3	++	F:gm	I	I	III	IIDC
15—	III	K	+				FP			III	IID
16—	I			+	3					III	ID
17—	II	n		+				I	IP	II	IIIC
18—	II	Kn		++	2—3		FgsP	I	I	II	IIIDC
19—	II					++	F:gP	I		I	IIICd
20—	I			+	2			I	I	II	IIC
21—	II	K		+			F:gP	I		III	I
22—	I			+	4	+		I	P	I	IC
23—	II							I		III	IC
24—	III	Kn	++				GgsPm	I		II	+D
25—	I			+			Fs			III	ID
26—	I						gsFs			I	IVCC
27—	II	K	+	+++	1—7		FP	II	I		IVC
28—	III	Knc					F:gp	I		II	±
29—	II			+	2	+	FPP	I	IP	I	ID
30—	II	Kn	+					I		III	IIDc
31—				+++	3		F:gsP	II	II	I	IIIC
32—	I	k		+	2		FP	I			ICA
33—	II	K		++	2—3		FP			III	IIC
34—	II	KKc					F:g			II	ID
35—	I							II	I	II	ID
36—	III	Kn				++	FFPP	I	I	II	IID
37—	II	K		++	2		F:gP	II	I	II	IIIC
38—										I	IID
39—	I							I		I	±
40—										II	ID
41—	II	K		+	2		FP	I	I	II	I
42—	II	Kcn				++	FgsP			II	ID
43—	III		+			++	FF:g			II	IID
44—	II							II	IP	II	III
45—	II						FgP	I		II	IIDC
46—				++	2—3					II	IIIC
47—	III			++	2—4		F:g			II	IIC
48—	II	K	+				FFPg		I	II	IIC
49—	II					++	F:g			I	IIIDC
50—	I					++	FgsP	I		I	ID
51—	I					+	F:g	I		I	I
52—	II	Kn		+	2	+	F:g	I	I	I	IID
53—	I						F:g			I	I
54—	II			++	2		F:g	I		II	IIIC
55—	III	Kn	+	+	2	++	FFgP	II		I	IIIDC
56—								I	I	I	ID
57—	III	Kn					FFgP	I		II	IDC
58—	II	n					F:g	I		II	ID

CUADRO II

RESUMEN DE PROTOCOLOS HISTOLOGICOS

MCA Inoculadas a 547 mm. Hg—QUITO

ECTODERMO						ENDODERMO				MESODERMO	
1 N°	2 Proliferc.	3 Ker Cor	4 Ad	5 Perlas—Sp	6 Perlas—CC	7 Infl. Infm.	8 Bacil distr	9 Prolif.	10 Inv g papl	11 Edema	12 Respst. celular
1—	II						F:g	I	II	IV	IIC
2—	II					++	F:g	I	I	±	±
3—	I					++		I		±	IIUc
4—	I						F:g			I	IIUc
5—	II									I	±
6—	I					+					IUc
7—	I					+				I	IIUc
8—	II	n		+	2		F:gs	II	I	I	ID
9—	—										—
10—	I			++	2—3		F:gP	I	I	I	IIC
11—	I					+	F:s				IU
12—	II	K					F:gP			II	ID
13—	I									I	±
14—	I							±		I	IIIU
15—	II	K		bacilos		+	F:g	I		I	ID
16—	I							I		I	I
17—	III					++	F:gs	I		III	I
18—	I	n					FP				II
19—	III	K				++	FF:g			I	IIICu
20—	I			++	3—4					I	III
21—	III	K				++	F:g			I	IIIC
22—	I					+	F:s	±		I	IIICU
23—	III	Kn	+			++	F:g	I		I	IIIC
24—	II	K				+		II	bacilos	I	IIICu
25—	II						F:g	I		I	IIU
26—	III	K					F:g	I		I	IIIC
27—	I					+	F:g	I	bacilos	I	IU
28—	I									I	ICu
29—	II					++	F:gs	I		I	IID
30—								I	bacilos	II	ID
31—	I							±		I	±
32—	II						F:g	±		II	IC
33—	III	K		+	2—	+	F:gP	I	I	II	IIC
34—	I	n		+	2	+	F:gs			I	ID
35—	II					++				I	ID
36—	II					++	F:gP			II	IIC
37—	I						F:g				ID
38—	I					+		I			±
39—	I									II	ICu
40—								I		I	IIIC
41—				+++	2—3			I		I	IIIU
42—	II						F:g			I	IVU
43—	I							I		I	
44—	II			bacilos		++				I	IIIC
45—				++±	2—4			II		II	IIU
46—										I	±
47—										I	±
48—	II						F:g	I	II	II	IIDC
49—	II	K					F:g			II	IIIC
50—	I			++	2	++	F:g	I		I	IIIU
51—	I							I		I	IIU
52—	I			+	2		F:g			I	IIICu
53—	II					++	F:g	I		II	IIIU
54—	II					++	FF:gP				IIC
55—	I	K					F:g			I	IID

CUADRO III

RESPUESTA CELULAR EN EL MESODERMO.—PROTOCOLOS HISTOLOGICOS
MCA inoculadas a 758 mm. Hg—GUAYAQUIL

TUBERCULO

		REACCION EXUDATIVA					REACCION PROLIFERATIVA			
1—Número	2—"eos"	3—Monon	4—Linfo	5—Epi	6—C. Gig	7—Necro	8—Caso	9—Conjt	10—Hial	11—Bacilos
1	R	R	D	++	+	±		BI		F:gD—2
2	VR	+++	D	++	+			BI()	+	D—4F:g x
3	iV	+	+	+				BI	+	D—3
4		++	+D	++	±			B		D—2 x
5										
6	VR	R	++	++	± ±			()		D—3 x
7	V	+V	+	+				B		D—4
8	RR	+	+	+++	++			B()	+++	D—4gPe
9		+						BB		D—3e
10	+V	+++	+	++	++			BB	+	D—4F:g
11	++i	R	R	++	++	+		BB	+	D—4
12	r	+	+							e x
13	i	R	R							D—2
14	ir	R	+	+++	++	+		B()		D—3Fge x
15	Vi	RV	±	+		+		BB	+	D—4
16	v	Rv	r					B		D—2
17	iR	++		++	++	+		B		
18		RR	R	+++	+++			BB	+	D—2
19	VR	R+	R+	+++	++	+	±	BB		D—4Fge x
20	iiV	R	R	+				BF		F:g2
21	i									F:gP
22	VFR	R++	++	++R	++	+		B	+	FgPe
23	V									
24	i	+	+	++				B		F:g x
25	i	ri	+	r				B		D—2
26	VRi	RR	RR	+++	+++	++		BB	+	D—4g
27	V	+++	R	++	++			B()	+	4FgPe
28	i			+	+					
29	F	RD+	R	++		±		B	+	FgsPe
30	V	R	+	+						
31	RRV	+RD	++	+++				BB	+	FgePD4
32	V	+	+	+				B		F:g
33	R	R	+	+R				B()	+	D—4 x
34	i	++		+				B		D—2 x
35	iiV		++							
36	i							B		F:gD—2b
37	II	iR	r					B		
38	RV	+	++	+				B		D—4
39	—									
40	r	+D	++	R						D—4
41		r		r				BB		D—2
42	r	++R	+	+				BB		D—4 ex
43	iiV	+++	++	+	+	+	+	B()()	+	D—3
44	iiR	++R	++	+R	+			B	+	D—3
45	R	+R	+D	DR+	+++	+		B()F		D—4 x
46	R	RR	R	+++				B	+	D—3
47	iR	++	++	++	+	+				D—2
48	Rii	+	+							FeD
49	+	VR	R	+		+		B		D—4 x
50	i	+++	++	++				B	+	D—4eF x
51	i	++	+					B		F:gPe
52	i	++	+	+				B		D—2 x
53	ir									
54	i	++R	++	+++	+			B	+	D—4 x
55	IVi	++R	R	++				BB		D—3 x
56	i	R	+R	r	±	±		BB		FsgD3 x
57	i	+	+	+	+	±		B()F		FegD—3
58		+	+					B		D—2

CUADRO IV

RESPUESTA CELULAR EN EL MESODERMO.—PROTOCOLOS HISTOLOGICOS

MCA inoculadas a 547 mm. Hg—QUITO

		TUBERCULO								
		REACCION EXUDATIVA				REACCION PROLIFERATIVA				
1—Número	2—"eos"	3—Monon	4—Linfo	5—Epi	6—C. Gig	7—Necro	8—Caseo	9—Conjt	10—Hial	11—Bacilos
1	iiF	+	+	DRR				B	+	D—2
2	i									
3	iiFD	+	+	+++R	+++	+++		B()()F		D—1,s
4	iiD	+	+	+++	+++	+++	+++	B()()F		D—2 b
5	—									
6	—			+				()F		D—1
7	i	++	++		±±±	+++	+++	()()F		D—2 b
8	i			+	+			B		D—1 e
9	—									
10	iiD	+	+	+	+			()F	+	D,e x
11	i			+	+	++		B()	+	D,b x
12	—	++		±	±	±		()F		D—2 ge x
13	i									
14	iii	+++D	+++F	+R	++	++	++	b		e—2
15	r		+	+r						d—2g x
16	—									
17	—									
18	ii									
19	++	+	+	+++	++	++	±±	()()()F	+	d—3
20	++									
21	VR	R	=	++	++	±		()()()F		D—2gs x
22	ii	+D	+d	+r	+	+		()()()F	+++	D—3 e
23	r			++	+++	+++	+	()()()F	+	D—1F++
24	rF			+		±		B		ge
25	F++	++		++	+			B		F,D—1
26	iiF	++	++	+		±±		B	+	
27	—	+	+	+	+					D—1
28	+rF		+	+				()()	+	D—1
29	r	++	++					B		D—1 e
30	+rF	+	+	+				B	+	ge x
31	i									
32	—		+	+						F,e Cep.
33	ii	+	+	+		±		B		D—2 Fe
34	d		+	+				B		F:g e
35	—	++	+			+		B		D,e
36	F	+++	+	+	±			()()F		D,e
37	F					+		()()F		D—2 x
38	i									
39	—			r				B		D—1
40	—	+++	++	++	+++	+++	+	()()F		D—2
41	D++	++	+					B		F:g
42	i	++		+	+++	+++	++	()()()F		g b
43	i									
44	RF	+RR						B		ge x
45	—			+	+			()()()		
46	i							B		e:g
47	—		+	+						e
48	i	++	+	+++	+++	+++	++	BB		D—3
49	i	+++	+	+++	+++	+++	+	B()F		D—1
50	++FR	+++	+	+	++	++		B()()F	+	D—1
51	—	+	+	+	++	+		B()F		e b
52	D		+	+				()()()B	++	ge
53	—		+	++	+++	+++	+	B()()F		D—1
54	+F	++F	+	++	+			B()()F		D—2 e
55	+F	+		+	+			B()()F		D—ee

CUADROS I y II

- K = keratinización (3) (entre paréntesis, el N° de columna)
c = cornificación.
n = formaciones nodulares de células ectodérmicas.
(2) Proliferación ectodérmica:
I = presencia de 2 o 3 hileras celulares.
II = presencia de 4 o 5 hileras celulares.
III = presencia de 6 o más hileras celulares.
Perlas Ad = adheridas al epitelio ectodérmico.
(4, 5, 6) Sp = separadas del mismo.
CC = capas concéntricas de las perlas ectodérmicas.
(7) Infl Ingm. = infiltración inflamatoria.
(8) Bacil dist = distribución de los bacilos:
F = fagocitados.
g = grumos, s = solitarios, aislados.
P = gruesos "paquetes".—m = apariencia de "microcolonias".
(9) Proliferación endodérmica: igual notación q' col. N° 2
(10) Invg = invaginaciones.
pal = formación de papilas evaginadas igual que N° 2.
(11 y 12) Edema del mesodermo y respuesta celular:
I = abarca hasta 1 mm. de espesor.
II = abarca entre 1 y 2 mm. de espesor.
III = abarca más de 2 mm. de espesor.
IV = reacción mayor de 5 mm. apreciable en campos.
D = focos dispersos.
C = focos confluentes.
± = respuesta celular mínima.

CUADRO III y IV

- R = agrupaciones celulares en racimos.
V = agrupaciones alrededor de los vasos.
i = forma infiltrante de reacción celular muy débil, difusa.
D = focos dispersos.
B = presencia de fibroblastos en el foco tuberculoso.
() = presencia de fibrocitos, colágeno, fibras.
F = en todo caso, indica reacción perifocal, a manera de manto
(12) Distribución de bacilos:
D = dispersos en el foco, grados relativos 1, 2, 3, 4.
g = grumos, s = aislados, solitarios, e = engolfados.
b = presencia de bacilos solamente en los bordes del foco.
± = reacción celular mínima.

CAPITULO IV

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El estudio de dos series de membranas corioalantoides inoculadas con bacilos tuberculosos ha permitido llegar a la conclusión de que estas formaciones extraembrionarias son excelentes medios para el estudio de la tuberculosis experimental. Se han empleado embriones de 9 días de edad, y la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis hominis*. No sólo la implantación del bacilo virulento sino también las lesiones consecutivas a su proliferación, ocurren adoptando ciertas características que permiten la separación neta entre las dos series de experimentos.

El tiempo límite para el desarrollo de las lesiones, en estas experiencias, permite establecer que la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, el desarrollo de las mismas es suficientemente rápido, como para lograr en corto período una serie de observaciones que, por otro lado, ocuparían mucho tiempo, utilizando los animales de laboratorio como cobayos, conejos, ratones etc. Sin embargo, el embrión no puede considerarse simplemente un medio de cultivo, sino un verdadero animal en el que ocurre una interrelación huésped-parásito.

Teóricamente, y admitiendo la posibilidad de mantener las condiciones de laboratorio rigurosamente controladas y uniformes, tanto a nivel del mar (Guayaquil) como a 2860 m. (Quito), se puede admitir que el único factor variable dentro de las condiciones experimentales, es la tensión parcial de oxígeno. Bajo estos ambientes de experimentación, la inoculación de la MCA con una cepa establemente virulenta, ha dado lugar a tipos fundamentales de respuesta celular. Entre estos tipos fundamentales, pueden distinguirse lo que serían formas mixtas o intermedias que por un lado permiten establecer la estrecha correlación de la respuesta celular específica del huésped frente a la presencia del mismo parásito, y por otro permiten un estudio de la evo-

lución de las lesiones. Es indudable también, que estas formas intermedias están indicando una ligera diferencia en la capacidad reactiva de cada embrión, posiblemente debida a factores de resistencia individual.

La primera impresión obtenida al efectuar los exámenes macroscópicos de las membranas y calificar el tipo de lesiones, es que en Guayaquil, la extensión de las lesiones, es mayor que en las membranas inoculadas en Quito. En la tabla VII se han agrupado estas lesiones, permitiendo la comparación de sus frecuencias relativas en las dos series de membranas (ver también tablas V y VI).

TABLA VII

Tipos de lesiones: frecuencias relativas

Lesiones	Guayaquil	Quito
1.—Foco solitario	29.2%	41.0%
2.—Focos dispersos	38.4%	45.9%
3.—Focos conglomerados (*)	32.4%	13.1%

En los resúmenes de protocolos histológicos (cuadro I para 758 mm. Hg y cuadro II para 547 mm. Hg), se puede seguir detalladamente la estructura de las lesiones ecto—, endo— y mesodérmicas. La intensidad de la respuesta celular, en otras palabras, la expansión de la lesión, aparece seguramente mayor en las membranas corioalantoideas inoculadas a nivel del mar (Guayaquil).

En dichos cuadros, la intensidad del edema y la respuesta celular en el mesodermo, están indicadas por valores que van de I a IV, para indicar valores convencionales de lesiones de leve intensidad, de mediana y de gran intensidad, respectivamente. Estos valores se refieren a cada una de las lesiones o focos observados en los cortes histopatológicos. No hay que confundir pues,

(*) "Lesiones gruesas" tablas V y VI.

este tipo de notación convencional adoptada a fin de poder explicar en un cuadro de conjunto, los hechos que se describen en el capítulo III. Según esta notación, la frecuencia relativa de lesiones de gran intensidad (III), para ambos grupos de MCA, es de 26% y 27% respectivamente (tabla VIII). Pero en el caso de las mem-

TABLA VIII

Reacción celular: frecuencias relativas

	I %	II	III	0
Guayaquil	36	29	26	9
Quito	29	27	27	17

branas de Quito, casi todos estos valores corresponden a lesiones únicas, no acompañadas sino de escasa respuesta celular difusa en toda la membrana, o también, de ninguna otra reacción celular circundante.

Aparentemente, existen dos tipos fundamentales de lesiones: mientras en las MCA inoculadas en Guayaquil la reacción celular es mucho mayor que en las MCA inoculadas en Quito, en éstas en cambio, la frecuencia de lesiones necróticas y caseosas es mayor (tabla IX).

TABLA IX

Elementos del folículo tuberculoso: frecuencias relativas %

	C. Epit.	C. Giga.	Necros.	Caseos.	Reacción Conjuntv.	Fibrosis
Guayaquil	74	31	26	1.7	76	15.5
Quito	73	47	40	16.5	67	43.5

Además, en las primeras, la cantidad de bacilos dispersos en los focos tuberculosos es mucho mayor que la can-

tividad de bacilos presentes en el centro y periferia de los focos tuberculosos de las segundas.

En otras palabras, mientras las membranas inoculadas en Quito presentan los elementos característicos de un folículo tuberculoso, con necrosis o caseosis rodeada por células gigantes y epitelioides, las membranas inoculadas en Guayaquil presentan elementos característicos del tejido de exudación tuberculoso, con células inflamatorias, mononucleares, y también células epitelioides y gigantes de Langhans.

En ambos grupos de membranas, la presencia de mononucleares, células epitelioides y células de Langhans, responde seguramente a un solo y el mismo tipo de estimulación, que parte del microorganismo patógeno. Se ha atribuído a varios de los componentes químicos del bacilo la propiedad de provocar la afluencia o formación de ciertos grupos de elementos celulares (v. cap. I.). Pero, como quiera que se admita este hecho, es evidente que no se puede explicar sólo como un fenómeno químico, menos aún cuando experimentalmente se observa que la cantidad de substancias de origen bacilar necesaria a la producción de una reacción específica es tan grande, que correspondería a muchos gramos de cuerpos bacterianos que nunca están presentes en la lesión "in vivo".

El conocimiento de la existencia en el bacilo, de una substancia citotóxica, que ya se sospechaba desde muchos años ha, es demasiado reciente ("cord factor") y no han sido aún consideradas experimentalmente sus potencialidades en la patogenésis de la lesión tuberculosa. Sin embargo, el solo hecho de una demostración cierta, sugiere la posibilidad de explicar muchos fenómenos que ocurren en la intimidad de los tejidos. Recordad por ejemplo que, los leucocitos que intervienen en la constitución de las imágenes histopatológicas de las MCA estudiadas, se presentan luego de un proceso de migración através de las paredes vasculares, y dentro de lo que podría considerarse como todo un complejo fenómeno vascular. Su disposición difiere, en cierto modo, en ambos grupos de membranas. Estos leucocitos se encuen-

tran en varios períodos de su desarrollo, según indican las granulaciones eosinófilas y basófilas, indicando el proceso activo de su producción y su afluencia hacia el foco lesionado, por estados sucesivos con mayor o menor premura. La presencia de formas jóvenes, "eosinófilos", puede ser suficiente indicación de la intensidad del proceso. Es sumamente interesante que estos leucocitos no formen parte de las lesiones propiamente dichas, sino que se dispongan a distancia, particularmente en las membranas inoculadas en Guayaquil, en que nunca se encuentran bacilos entre los "eosinófilos". Recordad a este respecto la acción de inhibición de migración de los leucocitos ejercida por el llamado "cord factor" (cap. I).

Desde este punto de vista, aparece una discrepancia con las ideas de Canat y Opie (81), quienes recuerdan la capacidad fagocitaria indiscutible de los granulocitos jóvenes, cuya presencia en zonas en que no se encuentran sino raros bacilos, indicaría una reacción capaz de retardar la invasión del bacilo tuberculoso.

En el momento presente, y como respuesta a una tendencia general de los investigadores, se admite (34, 90) el origen común de todas las células mononucleares presentes en la lesión tuberculosa. La diversidad morfológica, no correspondería sino, precisamente a la diversidad de estados fisiopatológicos que implican también una variedad de estímulos. Se consideran células idénticas, de idéntico origen, el monocito o célula transicional de la sangre, el clasmotocito o poliblasto o histiocito o célula adventicial de los tejidos, la célula epitelioides de la lesión tuberculosa („) (34, 90, 91, 92). En realidad, todas estas células no corresponden sino a una forma fundamental: el fagocito mononuclear presente en todo foco inflamatorio.

Ahora bien, la reacción más importante en las membranas corioalantoideas estudiadas en el presente trabajo, está a cargo del mesodermo. Son células meso-

(„)—La célula de Kupffer del sinusoide hepático, el fagocito de los senos esplénicos.

blásticas las que han sufrido proliferación y diferenciación y se han agrupado para dar las imágenes características. La lesión inicial se presenta de carácter inflamatorio, sin ningún elemento particular que permita clasificarle como inflamación tuberculosa. Los elementos jóvenes son estrictamente el producto de una exudación. Posteriormente, estos elementos van adquiriendo una disposición especial respondiendo a un proceso de carácter tóxico dependiente del número de bacilos, pero la forma primordial, el carácter típico se conserva, de manera que en las MCA de Guayaquil, el predominio del cuadro exudativo, que en último término debe ir, y va en efecto en algunos casos, a la necrosis, es evidente; mientras en las membranas de Quito, el carácter proliferativo, fibroso, es bien manifiesto.

La manifestación tóxica está representada por alteraciones vasculares, el edema generalizado del mesodermo y de las células, que es mayor en las membranas de Guayaquil, y la degeneración (de carácter mucoide) de las mismas.

Los fenómenos de necrosis celular han sido atribuidos a la hipersensibilidad establecida por algunos de los componentes del bacilo (tubérculo-proteínas, v. cap. I). El fenómeno mismo, aparece fundamentalmente de localización citoplasmática, y no correspondería en la lesión inicial, a una reacción general del organismo. Al menos esto puede deducirse de los trabajos de muchos investigadores (34, 37) que han estudiado cultivos de tejidos. Los bacilos que proliferan en la intimidad de los tejidos del huésped, son fagocitados por neutrófilos y monocitos que a su vez fagocitan a los mismos neutrófilos; así, los monocitos son los últimos encargados de transportar a los bacilos más profundamente. Los bacilos proliferan en el interior de su citoplasma, hasta desarrollar una hipersensibilidad, en cuyo caso, su necrosis y desintegración no se hacen esperar. Los cuadros I y II indican por un signo x las membranas en las que es posible seguir detenidamente este proceso, desde el ectodermo hasta el mesodermo. En muchos casos, parece que la hipersensibilidad no se manifiesta tan rápidamente como la proli-

feración, de allí que se puede ver verdaderos paquetes densos de bacilos llenando un macrófago vacuolado.

En las membranas de Quito, el proceso de hipersensibilización me parece estacionario en cierto modo de tal manera que la necrosis y caseosis han alcanzado una extensión definida y enseguida limitada por la reacción del huésped: **la fibrosis encapsulante**. Parece como si, luego de un primer estadio de hipersensibilidad, se estableciera una fase inmunitaria, capaz de impedir la posterior invasión mesodérmica por el bacilo. Un hecho bien conocido es el que los bacilos intracitoplasmáticos comienzan a multiplicar enseguida —dentro de 24 hs. siguientes a la exposición, según trabajos de Mackaness et al. (37)— dando lugar a muerte y lisis inmediata del macrófago (37, 34, 92), para luego dar lugar a aparición de un fenómeno de resistencia celular, de carácter inmunitario, de manera que posteriormente, la multiplicación de los bacilos se realiza más lentamente, por producirse una reacción entre ellos y las células.

Una lesión que tiene el carácter destructivo, incluso muy precozmente, es, desde el punto de vista del huésped, más benigna si se deja rodear por un tejido de resistencia. En efecto, la proliferación conectival posterior indicaría una respuesta positiva de defensa del organismo huésped, y por esto, una evolución tardía favorable.

Una desventaja de la utilización del embrión de pollo en el estudio de la tuberculosis experimental, sería la imposibilidad de seguir más allá de un tiempo estrictamente limitado por su propia evolución. Por esto, lo que se puede constatar son fenómenos primordiales de la infección tuberculosa, lo que podría considerarse un primoinfección, y no los procesos consecutivos a la reacción del organismo huésped, ante la cronicidad de la infección. De aquí que, en los dos grupos de membranas, a pesar de que el proceso es completamente definido, se presenta incompleto, si bien es cierto que se puede prever la caseificación de la mayoría de las lesiones de las membranas de Guayaquil, y la franca regresión de los tubérculos caseosos de las membranas de Quito.

De todos modos, este trabajo de carácter experi-

mental, no puede llegar a conclusiones definitivas y significa más bien, el planteamiento de todo un complejo plan de investigación en el futuro.

SUMARIO:

1—Se ha realizado la inoculación de membranas corioalantoideas de embriones de pollos de nueve días de edad, con dosis constantes, de 0.1 mg. en 0.25cc. de solución salina, de bacilos de cultivo en medio Tween-albúmina, de siete días de edad, de *M. tuberculosis hominis*, cepa H37Rv.

2—Las experiencias se han efectuado en dos grupos: el uno, de inoculaciones a nivel del mar (Guayaquil), y el otro, de inoculaciones a 2860 m. sobre el nivel del mar (Quito), manteniendo estables las condiciones de laboratorio, admitiendo como único factor variable, la tensión parcial de oxígeno, dependiente de la altitud.

3—Después de seis días de inoculación, se han examinado las lesiones producidas en las MCA, macroscópicamente y en cortes histológicos coloreados con hematoxilina-eosina y por una técnica modificada de Gallego.

4—Se hace una discusión de las imágenes histológicas, llegando a concluir que las membranas inoculadas a nivel del mar, predominan las lesiones de tipo exudativo-necróticas, y en las membranas inoculadas a 2860 m. predominan las lesiones proliferativo-necróticas.

5—Se discute el posible origen de esta diferencia de lesiones, atribuyendo en parte a una variación de la virulencia del bacilo.

BIBLIOGRAFIA :

- 1—Ong, S. G., Den Dooren de Jong, L. E. Schornagel H. E. 1947. De behandeling van experimenteele tuberculose met lage zuurstofspanning. Kon. Ned. Akademie v. Wetenschappen. 51: 101-120.
- 2—Werkman, C. H., Wilson, P. W., edit. "Bacterial Physiology". New York, 1951.
- 3—Smith, D. T., Martin, D. S., edit. "Bacteriología de Zinsser" México, 1951.
- 4—Wilson, G. S., Miles, A. A., edit. "Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity". Baltimore, 1946.
- 5—Dubos, R. J. edit. "Bacterial and Mycotic Infections of Man". Philadelphia, 1948.
- 6—Lamanna, C. 1946.—Ehe nature of the acid-fast stain.—J. Bact. 52 (1) : 99-103.
- 7—Knaysi 1929. Cita del mismo A. en Werkman. v. Nº 2.
- 8—Yegian, D., Porter, K. R. 1944.—Some artifacts encountered in stained preparations of tubercle bacilli. I. Non acid-fast formas arising from mechanical treatment. J. Bact. 48: 83-91.
- 9—Merril, M. H. 1931.—Studies en carbon metabolism of organismus of the genus Mycobacterium, III. End products of carbohydrate utilization as determined in synthetic media cultures.—J. Bact. 21: 375-381.
- 10—Ruppel 1898. v. Nº 2.
- 11—Uga, N. L. 1935. Jap. J. Exp. Med. 13: 167.
- 12—Buc, E. 1923. Compt. Rend. Soc. de Biol. 88: 1135.
- 13—Buc, E. 1924. Revue de la Tuberc. 5: 520.
- 14—Rahn, O., Richardson, G. L. 1941.—Oxygen demand and oxygen supply.—J. Bact. 41: 225-249.
- 15—Boecker, E. 1923. Ztschr. f. Hyg. u. Infekt. 99: 121.
- 16—Cohn, M. L. 1944.—Growth of human tubercle bacilli under restricted air conditions.—Am. Rev. Tuberc. 49: 463.
- 17—Edson, N. L. 1951.—The intermediary metabolism of the Mycobacteria.—Bact. Rev. 15: 147-204.
- 18—Uovy, F. G., Soule, M. H. 1925.—Microbic respiration. II. Respiration of the tubercle bacillus.—J. Infect. Dis. 36: 168-232.
- 19—Novy, F. G., Soule, M. H. 1927.—Warthin Anniversary. Voi. 1, pág. 13.
- 20—Stephenson, M., Whetham, M. D. 1924.—Studies in the fat metabolism of the timothy grass bacillus. II. The carbon balance-sheet and respiratory quotient.—Proc. Roy. Soc.; (London), B, 95: 200-206.
- 21—Heplar, J. Q. 1953.—Respiratory quotients of tubercle bacilli at low oxygen tension.—Am. Rev. Tuberc. 67: 669-670.
- 22—Luria, L. 1952.—Respirazione del Micobatterio Tuberculare

- cultivato in terreno di Dubos.—Giorn. Batt. Omm. 44 (5-6) : 161-189.
- 23—Kempner, W. 1939.—Oxygen tension and the tubercle bacillus.— *Am. Rev. Tuberc.* 40: 157-168.
- 24—Loebel, R. O., Shorr, E., Richardson, H. B. 1933.—The influence of adverse conditions upon the respiratory metabolism and growth of human tubercle bacilli.—*J. Bact.* 26: 167-200.
- 25—Loebel, R. O., Shorr, E., Richardson, H. B. 1933.—The influence of foodstuffs upon the respiratory metabolism and growth of human tubercle bacilli.—*J. Bact.* 26: 139-166.
- 26—Corper, H. J., Gauss, Rensch. 1921.—*Am. Rev. Tuberc.* 5: 562.
- 27—Corper, H. J., Lurie, M. B., Uyei, N. 1927.—The importance of the growth of tubercle bacilli as determined by gaseous tension.—*Am. Rev. Tuberc.* 15: 65.
- 28—Ebina, T., Nakamura, T., Inomata, K., Tohoku, D. 1938.—*J. Exp. Med.* 32: 1-9.
- 29—Davis, R. 1940.—*Br. J. Exp. Path.* 21: 243.
- 30—Andrejew, A. 1947.—Les échanges respiratoires de bacilles tuberculeux de souches différentes.—*Ann. Inst. Pasteur* 73: 235-241. ver también:
Andrejew, A. 1946.—Sur la végétation du bacille de Koch en profondeur.—*Ann. Inst. Pasteur.* 72: 891-907.
- 31—Potter, T. S. 1943.—The death of tubercle bacilli subjected to oxygen deprivation in the presence of moisture and warmth.—*J. Infect. Dis.* 71 (3) : 220-224.
- 32—Richardson, H. B. 1933.—*Trans. Nat. Tuberc. Assoc.* 29: 161.
- 33—Dieckmann, H., Menzel, G., *Ztschr. f. Hyg.u.Infekt.* 113: 709.
- 34—Rich, A. R. "The Pathogenesis of Tuberculosis". Springfield, 1951.
- 35—Dubos, R. J. 1950.—The effect of organic acids on mammalian tubercle bacilli.—*J. Exp. Med.* 92: 319-332.
- 36—Hirsch, J. G., Dubos, R. J. 1952.—The effect of spermine on tubercle bacilli.—*J. Exp. Med.* 95 (2) : 191-208.
- 37—Mackness, G. B., Smith, N. 1952.—The action of isoniazid (isonicotinic acid hydrazide) on intracellular tubercle bacilli.—*Am. Rev. Tuberc.* 66 (2) : 125-133.
- 38—Medlar, E. M., Bernstein, S., Steward, D. M. 1952.—A bacteriologic study of resected tuberculous lesions.—*Am. Rev. Tuberc.* 66 (1) : 36-43.
- 39—Beck, F., Yegian, D. 1952.—A study of the tubercle bacillus in resected pulmonary lesions.—*Am. Rev. Tuberc.* 66 (1) : 44-51.
- 40—Vorwald, A. J. 1937.—Experimental tuberculous infection in the guinea pig foetus compared with that in the adult.—*Am. Rev. Tuberc.* 35: 260. ver también.

- Editoriales: "Tubercle bacillus in the tissues". *Lancet* v. 263, 971. Nov. 15 '52.
- Editoriales: "Tubercle bacillus in the tissues". *Lancet* v. 263: 971. Nov. 15 '52.
- 41.—Rich, A. R., Follis, R. H. Jr. 1942. The effect of low oxygen tension upon the development of experimental tuberculosis. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 71: 345-363.
- 42.—Lurie, M. B. 1939.—The role of extracellular factors and local immunity in the fixation and inhibition of growth of tubercle bacilli.—*J. Exp. Med.* 69: 555.
- 43.—Cambell. cita de Ong y otros. v. N° 1.
- 44.—Soltys, M. A. 1952.—An antituberculous substance in tuberculous lymph nodes.—*Nature* 169: 1095.
- 45.—Cartagenova, L. 1941.—Tesis Doctoral. Univ. Central Quito.
- 46.—Pierce, C., Dubos, R. J., Middlebrook, G. 1947.—Infection in mice with mammalian tubercle bacilli grown in Tween-albumin liquid medium.—*J. Exp. Med.* 86: 159-174.
- 47.—Azzi, Azzo. "Microbiologia e Immunologia". Milano, 1938.
- 48.—Middlebrook, G., Dubos, R. J., Pierce, C. 1947.—Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli.—*J. Exp. Med.* 86: 175-184.
- 49.—Middlebrook, v. N° 51.
- 50.—Dubos, R. J., Middlebrook, G. 1948.—*Am. Rev. Tuberc.* 58: 698. v. también:
50^a Dubos, R. J. 1948.—Cellular structures and functions concerned in parasitism.—*Bact. Rev.* 12: 173-194.
50b. Dubos, R. J., Middlebrook, G. 1948.—The effect of wetting agents on the growth of tubercle bacilli.—*J. Exp. Med.* 88: 81-98.
50c. Bloch, H., Noll, H. 1953.—Studies on virulence of tubercle bacilli: Variations in virulence effected by Tween 80 and thiosemicarbarzone.—*J. Exp. Med.* 97 (1): 1-16.
50d. Dubos, R. J., Davis, B. D., Middlebrook, G., Pierce, C. 1946.—The effect of water soluble lipids on the growth and biological properties of tubercle bacilli.—*Am. Rev. Tuberc.* 54: 204-212.
- 51.—Bloch, H. 1950.—Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms.—*J. Exp. Med.* 91: 197-218. To see also:
51^a Bloch, H. 1950.—Studies on the virulence of tubercle bacilli. The relationship of the physiological state of the organisms to their pathogenicity.—*J. Exp. Med.* 92: 507-526.
- 52.—Bloch, H., Sorkin, E., Erlenmeyer, H. 1953.—A toxic lipid component of the tubercle bacillus ("Cord Factor"). Isolation from petroleum ether extracts of young bacterial cultures.—*Am. Rev. Tuberc.* 67: 629-643.
- 53.—Noll, H., Bloch, H. 1953.—A toxic lipid component of tubercle bacillus ("Cord Factor"). Occurrence in chloroform ex-

- tracts of young and older bacterial cultures.—*Am. Rev. Tuberc.* 67: 828-852.
- 54—Asselinenu, —, Bloch, H., Lederer, E. 1953.—A toxic lipid component of the tubercle bacillus ("Cord Factor"). Occurrence and distribution in various bacterial extrats.—*Am. Rev. Tuberc.* 67: 853-858. Ver también:
54^a Friedmann, I., Russell, K. 1953.—Serpiginous growth of tubercle bacilli in media containing embryonic tissue.—*J. Path. Bact.* 65: 495-500.
- 55—Kirby, W. M. M., Dubos, R. J. 1952.—Effect of penicillin on the tubercle bacillus "in vitro".
- 56—Tison, F. 1953.—Nouvelle technique D'inoculation au Cobaye de Produits Surinfectés pour la recherche du Bacille Tuberculeux. Usage de L'Aureomycine.—*Ann. Inst. Pasteur* 85: 274-277.
- 57—Dubos, R. J., Davis, B. D. 1946.—Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media.—*J. Exp. Med.* 83: 409-423.
- 58—Muggia, A. 1948.—Factores Ambientales y Mutaciones Biológicas. (De algunas propiedades biológicas del bacilo de la tuberculosis).—*Bol. Inf. Cient. Nac. Quito.* v. II (13-14): 46-55.
58^a Muggia, A. 1926. Sulla attenuaxiones del bacillo del tubercolo per mezzo di sostanze chimiche. *Gior. Batt. Imm.* I, 2.
58b. Muggia, A. 1926. Ricerche ed osservazioni sulla tubercolois sperimentale del testicolo. *Gior. Batt. Imm.* I, 9.
58c. Muggia, A. 1927. Sulla attenuaxiones e ripresa della virulenza del bacilo del tubercolo. *Gior. Batt. Imm.* II, 3.
58d. Muggia, A. 1928. Comportamento della cutireazione alla tubercolina rapporto al soggiorno in alta montagna. *Minerva Medica*, N° 23 bis. (Volumen en honor de P. Giacosa).
- 59—Brueck, J. W., Buddingh, G. J. 1952.—Isolation of *M. tuberculosis* by inoculation of the yolk sac of embryonated eggs. *Proc. Soc. Expl. Biol. and Med.* 80: 589-591.
- 60—Steenken, W. Jr., Gardner. L. U. 1946.—History of H37 strain of tubercle bacillus.—*Am. Rev. Tuberc.* 54: 62-66.
- 61—Levaditi, 1906. Cita de varios AA. v. Nos. 5, 75, 80, etc.
- 62—Rous, P., Murphy, J. B. 1911.—Tumor implatations in the developing chick embryo. Experiments with a transmissible sarcoma of fowls. *J. A. M.* 56: 741-742.
- 63—Murphy, J. B. (Sobre implantación del sarcoma transmisibile y de tejido embrionario de mamíferos en embrión de pollo): *J. Exp. Med.* 17: 482-493, 19B; 19: 181-186, 1914; 19: 513-522, 1914.
- 64—Clark, E. R. 1920.—Technique of operating on chick embryos.—*Science* 51: 371-373.
- 65—Goodpasture, E. W., Woodruff, A. M., Buddingh, G. J. 1931. The cultivation of vaccine and other viruses in the chorio-

- allantoic membrane of the chick embryo. *Science* 74: 371-372.
- 66—Woodruff, A. M., Goodpasture, W. E. 1931.—The susceptibility of the chorio-allantoic membrane of chick embryos to infection with the fowl-pox virus.—*Am. J. Path.* 7: 209-222.
- 67—Lillie, R. D. 1935.—Histologic reaction to the virus of the Rocky Mountain spotted fever in chick embryos.—*Publ. Health Rep.* 50: 1498-1501.
- 68—Goldsworthy, N. E., Moppett, W. 1935.—The reactions of the chorio-allantoic membrane of the chick to certain physical and bacterial agents.—*J. Path. and Bact.* 41: 529-551.
- 70—Schneider, B. 1940.—Beiträge zur functionellen Bedeutung embryonalen organ.—*Arch. f. Entwcklug smechn. d. organ.* 140: 463-494.
- 71—Goodpasture, E. W., Anderson, K. 1937.—The problem of infection as presented by bacterial invasion of the chorio-allantoic membrane of chick embryos.—*Am. J. Path.* 13: 149-174.
- 72.—Buddingh, G. J., Polk, A. D. 1939.—Experimental meningococcus infection of the chick embryo.—*J. Exp. Med.* 70: 485-498; On pathogenesis, *J. Exp. Med.* 70: 499-510; On passive immunity, *J. Exp. Med.* 70: 511-520.
- 73.—Bang, F. 1941.—Experimental gonococcus infection of the chick embryo. *J. Exp. Med.* 74: 387-396.
- 74.—Costil, L., Bloch, F. 1938.—Reactions of the membrane chorioallantoïde de l'embryon de poulet aux bacilles tuberculeux humaines et aviaires.—*Compt. rend. Coc. de Biol.* 128: 40-42.
- 75.—Moore, M. 1939.—The chorio-allantoic membrane of the developing chick on a medium for the cultivation and histopathologic study of pathogenic fungi. *Science*, 89: 514.
- 76.—Moore, M. 1941.—The chorio-allantoic membrane of the developing chick on a medium for the cultivation and histopathologic study of pathogenic fungi. *Am J. Path.* 17: 103.
- 77.—Moore, M. 1941.—Reaction of the chorio-allantoic membrane of the developing chick to inoculation with some Mycobacteria.—*Bull. Am. Ecad. Tub. Phys.* Julio, 5: 83.
- 78.—Moore, M. 1941.—Tuberculosis (human and avian) and leprosy (rat) experimental production in the chorio-allantoic membrane of the developing chick. *J. Bact.* 41: 786.
- 79.—Moore, M. 1942.—The chorio-allantoic membrane of the chick embryos and its response to inoculation with some Mycobacteria. *Am. J. Path.* 18: 827-847.
- 80.—Emmart, E. W., Smith, M. I. 1941.—The growth and effects of the tubercle bacillus on the chorio-allantoic membrane of the chick embryo: a method for studies in chemotherapy.—*Publ. Health Rep.* 56: 1277-1286.
- 81.—Canat, E. H., Opie, E. L. 1943.—Inflammation in embryonic

- life. II. Infection of chick embryos with avian tubercle bacilli. *Am. J. Path.* 19: 385-394.
- 82.—Fite, G. L., Olson, B. J. 1944.—The infectivity of *Mycobacteria* for chorio-allantoic membranes of chick embryos.—*Publ. Health Rep.* 59: 1423-1436.
- 83.—Emmart, E. W., Smith, M. I. 1943.—The chorio-allantoic membrane of the chick embryos as a medium for testing the virulence of tubercle bacilli.—*Am. Rev. Tuberc.* 47: 426-434.
- 84.—Rivers, T. M. edit. "Viral and Rickettsial of man". Philadelphia, 1948. Ver "Chick Embryo Technics" por E. W. Goodpasture y G. J. Buddingh, pp. 97-113.
- 85.—Beveridge, W. I. B., Burnet, F. M. 1946.—"The cultivation of viruses and rickettsiae in the chick embryo". Medical Research Council. Special Report Series N^o 256. London.
- 86.—Kolmer, J. A., Boerner, F. "Métodos de Laboratorio Clínico". Trad. M. Manrique.—New York, 1943.
- 87.—Langeron, M. "Précis de Microscopie". Paris, 1949.
- 88.—Hamilton, H. L. 1952.—Sensitive periods during development (of chick embryo).—*Ann. New York, Acad. Sci.* 55: 177-188.
- 89.—Muñoz, A. Comunicación personal. (Life).
- 90.—Fernández, J. 1953. Estudo sobre as células gigantes, com particular referencia as da tuberculose (Langhans) e a de corpo estranho.—*O Hospital*, 43: 633-676.
- 91.—"Bailey's Text-Book of Histology". ed. rev. for P. E. Smith and W. M. Copenhaver. Baltimore, 1948.
- 92.—Ribbert, H., Hamperl, H. "Tratado de Patología General y Anatomía Patológica". Barcelona, 1950.