

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EFFECTO DEL ISOPRINOSINE (METISOPRINOL)
EN LA INFECCION EXPERIMENTAL DE LA
GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE DEL CERDO**

TESIS RECEPCIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
p r e s e n t a
FABIOLA CORTES MARQUEZ

ASESORES: M.V.Z. Pablo Hernández Jáuregui
M.V.Z. Joaquín García Rivas

México, D. F.

8212

Junio de 1979



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN	
INTRODUCCION	1
ETIOLOGIA	1
PATOGENIA	2
ULTRAESTRUCTURA	3
CICLO VIRAL A NIVEL ULTRAESTRUCTURAL	3
TERAPIA	4
OBJETIVO	5
MATERIAL Y METODOS	6
RESULTADOS	8
EVALUACION CLINICA	8
MICROSCOPIA DE LUZ	8
ULTRAESTRUCTURA	8
CONCLUSION Y DISCUSION	10
BIBLIOGRAFIA	13

EFFECTO DEL ISOPRINOSINE (METISOPRINOL) EN LA
INFECCION EXPERIMENTAL DE LA GASTROENTERITIS
TRANSMISIBLE DEL CERDO

FABIOLA CORTES MARQUEZ

Aseores:

M.V.Z. Pablo Hernández Jáuregui

M.V.Z. Joaquín García Rivas

El Isoprinosine (sal del ácido paracetamidobenzoico) es una droga con propiedades antivirales, las cuales han sido descritas contra algunos virus tanto "in vivo" como "in vitro". El objetivo del presente estudio fue probar su efecto contra el virus de la gastroenteritis transmisible de cerdo. La evaluación histológica así como el estudio de la interacción de la célula intestinal y el virus a nivel ultraestructural. Para el experimento se utilizaron doce lechones que se dividieron en cuatro grupos:

- A) siete lechones inoculados con el virus G.E.T. y a las veinticuatro horas se les suministró el Isoprinosine oral cada cuatro horas a dosis de 50 mg./kg./dfa/lechón.
- B) Dos lechones se infectaron y no se les administró la droga.
- C) Dos lechones controles sin infectar, se les dió solamente el Isoprinosine a la misma dosis durante el mismo tiempo que a los lechones problema.
- D) Un control que se le suministró placebo.

En el transcurso del experimento se observaron los signos clínicos en todos los lechones infectados con el virus del G.E.T., incluyendo los lechones que estaban recibiendo el Isoprinosine, por lo que se decidió sacrificar a los que estaban moribundos. Se tomaron fragmentos del intestino delgado para estudios en microscopía de luz y electrónica. Observándose en todas ellas una marcada atrofia de las vellosidades intestinales y partículas virales en diferentes etapas de su replicación. Los resultados indican que el Isoprinosine no es eficaz en el tratamiento de la G.E.T. ni altera el ciclo de replicación del virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo en las dosis utilizadas.

Junio 12, 1979.

EFFECTO DEL ISOPRINOSINE (METISOPRINOL) EN LA INFECCION
EXPERIMENTAL DE LA GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE
DEL CERDO

INTRODUCCION

En 1946 Doyle y Hutching fueron los primeros en describir la gastroenteritis transmisible del cerdo, como una de las principales causas de muerte en los lechones del Este de los Estados Unidos. Sugirieron también su etiología viral, como "un agente infeccioso de naturaleza filtrable".

La gastroenteritis transmisible (G.E.T.) es una enfermedad entérica que afecta a los cerdos de cualquier edad, la mortalidad es del 100% en los lechones menores de dos semanas de edad, la cual va disminuyendo después de las cinco semanas de edad.

Ha quedado demostrado que es inducida por un virus (Bohl y col., 1969), altamente contagiosa (morbilidad 100%). El periodo de incubación es corto de 18 a 72 horas, caracterizada por vómito, diarrea profusa, deshidratación y pérdida rápida de peso.

ETIOLOGIA

El agente causal es un virus del grupo de los coronavirus (Tajima 1970, Bohl y col. 1969). Presenta las siguientes características: Mide de 70 a 180 nm., contiene un genoma ARN, es moderadamente pleomórfico, estable a un Ph de 3, sensible al éter y al formol, en su superficie

presenta proyecciones que semejan la corona solar.

Sus nucleocapsides se desarrollan en el citoplasma y maduran en vesículas citoplásmicas (Wagner y col. 1973).

El virus puede ser aislado ya sea en cultivo de tejidos de cerdo (Hancock y col. 1959, Harada, 1963, Lee, 1956), o bien al través de inoculaciones en lechones (Hooper and Haelterman, 1966a).

PATOGENIA

El virus es ingerido e infecta las células epiteliales columnares del intestino delgado; como resultado de la replicación viral, la cual se lleva al cabo en 4 ó 5 horas, se libera el virus al lumen del intestino y las células infectadas, lisadas, son eliminadas a la luz intestinal.

Después de varios ciclos de replicación viral, la mayoría de las células del intestino involucradas dan lugar a la condición descrita como "atrofia de las vellosidades intestinales" en la cual las vellosidades se encuentran dramáticamente reducidas en longitud.

Las anomalías epiteliales, se demuestran plenamente a las 24 horas, después del inicio de la infección y está proporcionalmente relacionado con la cantidad de virus infectante adquirida, la edad del cerdo, la virulencia del virus y probablemente la presencia de anticuerpos adquiridos por inmunidad pasiva al través del calostro en el lumen intestinal (Staley, 1969). Es evidente que la atrofia de vellosidades intestinales condiciona un síndrome de absorción intestinal deficiente, que se refleja por el estado nutricional de los animales infectados

(Haelterman, 1972, Hooper and Haelterman, 1966b, Thake, 1968).

ULTRAESTRUCTURA

Los estudios con el microscopio electrónico en células del intestino infectadas por el virus de G.E.T., han revelado las siguientes alteraciones celulares:

En las microvellosidades acortamiento, reducción en número y distribución irregular, mitocondrias inflamadas, retículo endoplásmico granular. Partículas virales, sobre todo dentro de vesículas citoplásmicas (Chadler y col. 1969, Olson, 1973, Thake 1968, Waxler, 1972).

CICLO VIRAL A NIVEL ULTRAESTRUCTURAL

Wagner y col., 1973, postulan que la entrada del virus de la G.E.T. dentro de las células epiteliales del intestino de los lechones recién nacidos, se efectúa al través de una red de túbulos citoplásmicos de origen plasmalémico.

En animales no infectados aparecen túbulos similares que parecen ser los responsables de la absorción indiscriminada de grandes cantidades de macromoléculas del calostro durante los primeros días de vida (Mattisson, 1957, Staley, 1969). Subsecuentemente a la entrada del virus en la célula, se suscita un periodo de eclipse (Fig. A - I). La replicación viral ocurre dentro de las invaginaciones de los microcanales y se hace plenamente aparente mediante la maduración viral en vesículas intracitoplásmicas (Fig. A - II). Una vez alcanzada la replicación viral, la célula se destruye y deja libres las partículas virales por medio del sistema de exclusión de membranas, comun a mu

chas infecciones virales; sin embargo este proceso se lleva al cabo con mucha rapidez y es difícil visualizarlo al microscopio electrónico (Fig. A - III).

TERAPIA

En la actualidad no hay un tratamiento efectivo contra la gastroenteritis transmisible del cerdo, sobre todo en lechones menores de 10 días de edad.

Bay y col., 1952, hicieron un estudio en lechones de 1 a 5 días de edad, infectados experimentalmente con G.E.T. a los que les fueron administradas con fines terapéuticos: circulina, estreptomycin y cloromicetina, sin encontrar ningún beneficio.

Whitehair y col., 1948 sí notaron cierta mejoría en lechones destetados, infectados, al administrárseles sulfatiazol o sulfaguanidina disminuyeron los signos clínicos y aumentaron de peso. También Wallas y Whitehair, 1965, reportan mejorías al administrar clortetraciclina a lechones de 11 días de edad.

Es probable que dichas mejorías en lechones de 2 a 5 semanas de edad tratados con antibacterianos se hayan debido a que reducían las complicaciones secundarias por bacterias.

Inclusive se han probado sueros inmunes orales (Haelterman, 1963), sangre completa oral (Noble, 1964) con cierto éxito terapéutico. Como tratamiento paliativo es aconsejable administrar suero oral y proporcionar un medio ambiente seco.

El medicamento "Isoprinosine" (también conocido como NPT 10.381, NP 113, Isoprinosina o Metisoprinol), se encuentra actualmente en el mercado de México, éste tiene capacidad antivírica avalada por estudios realizados por sus descubridores: Gordon, Glasky, Brown, Ron- sen, Lynes, Woodard y col.

El Isoprinosine es un producto de condensación del ácido para acetamido- benzoico, inosina y dimetilaminoisopropanol en una proporción de 1:3 (Doty y col., 1970) (Ver fig. B.). Se sugiere que su mecanismo de acción es sobre los ribosomas del hospedador alterándolo de tal forma que hace ineficaz el ARN mensajero del virus para su replica- ción.

OBJETIVO

Teniendo en cuenta que el Isoprinosine actúa inhibiendo el ARN mensa- jero viral para su replicación, es nuestro interés probar su efecto, con- tra el virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo, ya que produ- ce grandes pérdidas económicas a los porcicultores del país por su ele- vada morbilidad y mortalidad en lechones. La evaluación histológica, así como el estudio de la interacción de la célula intestinal y el virus, a nivel ultraestructural, permitirán interpretar los posibles efectos que el Isoprinosine tenga sobre el virus en cuestión.

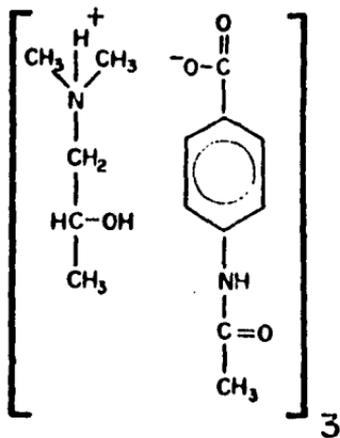
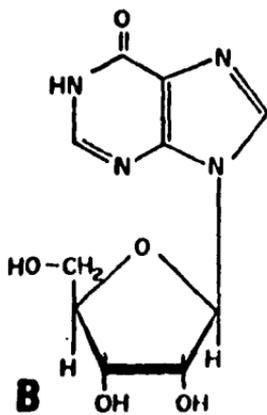


A

I

II

III



MATERIAL Y METODOS

Se utilizó Isoprinosine en tabletas suministradas por vía oral a dosis de 50 mg/kg de peso. Para producir la enfermedad, empleamos el virus de la gastroenteritis transmisible cepa Texcoco aislada en el INIP a partir de un brote de campo por el Dr. Antonio Morilla y por el Dr. Ramón Bautista en diciembre de 1977. La cepa ha sido mantenida a través de pases en lechones susceptibles. El virus tiene un título de 10^3 dosis infectante por ml. inoculado por vía oral a lechones de 1 a 3 días de nacidos (10^3 /DL/ml/oral/lechón/dfa).

Usamos 12 lechones recién nacidos (1 a 3 días de edad) que fueron divididos en cuatro grupos:

- a) 7 lechones se inocularon con el virus de G.E.T. por vía oral; después de transcurridas 24 horas, se les administró Isoprinosine 50 mg/kg/1 dfa/lechón, cada 4 horas durante 5 días.
- b) A dos lechones controles se les infectó y no se les administró la droga.
- c) Dos controles sin infectar se les dió solamente el Isoprinosine a la misma dosis y durante el mismo tiempo que a los lechones problema.
- d) Un control al que se le suministró placebo.

Diariamente se estudiaron los animales, para detectar cualquier signo clínico de la enfermedad. Todos los cerdos que presentaron signos clínicos de enfermedad al grado de peligrar su vida, fueron sacrifica-

dos por electrocución y se procedió a realizar la necropsia.

Se obtuvieron tejidos representativos de yeyuno e ileon de las áreas que macroscópicamente mostraban lesión. El material fue dividido para estudios de microscopía de luz y electrónica.

Para microscopía de luz, se fijaron fragmentos de intestino delgado en formalina al 10% para estudios convencionales de parafina.

Para microscopía electrónica la muestra fue fragmentada finamente y fijado en glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos pH 7.4 por una hora y media (Sabatini, 1963) y postfijado por una hora, en tetróxido de osmio al 1% (Millonig, 1962). Posteriormente se deshidrataron en alcoholes de concentración ascendente y se incluyeron en resinas de araldita (Glauert y col., 1958). Después de la polimerización se obtuvieron cortes de una micra en un ultramicrotomo Porter Blum MT-2 y se tiñeron con Paragón, con objeto de seleccionar el epitelio de la luz intestinal. Una vez logrado ésto se rebajaron los tejidos dejando exclusivamente el área por estudiar y se seccionaron de 400 a 600 Å, se recogieron en rejillas de cobre, se contrastaron con citrato de plomo (Reynolds, 1963) y acetato de uranilo (Watson y col. 1958) y se observaron en un microscopio electrónico Phillips EM-300.

RESULTADOS

EVALUACION CLINICA

Todos los lechones que fueron inoculados con el virus de la G.E.T., enfermaron a los 2-3 días de post infección inclusive a los que se les estaba administrando el Isoprinosine oral.

Así que se decidió sacrificar a los que estaban moribundos, entre el 5° y el 6° día, por medio de electrocución.

A la necropsia era aparente la deshidratación, el intestino delgado estaba distendido con un fluido amarillento espumoso, las paredes adelgazadas y transparentes, debido a la atrofia de las vellosidades.

MICROSCOPIA DE LUZ

Las observaciones hechas al microscopio de luz revelaron la evidente atrofia y acortamiento de las vellosidades en comparación con las vellosidades de los lechones control (Foto 1 y 2). X 400.

ULTRAESTRUCTURA

Con el microscopio electrónico pudimos corroborar que las lesiones a las células y el crecimiento viral eran muy similares tanto en los cerdos infectados no tratados como en los infectados tratados con Isoprinosine, por lo que se describirán simultáneamente.

Las microvellosidades intestinales se encontraron reducidas en tamaño y en número al grado que muchas células sólo mostraron algunas microvellosidades y la presencia de partículas virales en diferentes etapas de replicación.

La microfotografía # 3 muestra una célula de absorción epitelial de un control. Las microvellosidades (MC) llenan el borde apical de la célula y tienen las dimensiones normales. Retículo endoplásmico rugoso (R) membrana intercelular (M). X 40 000.

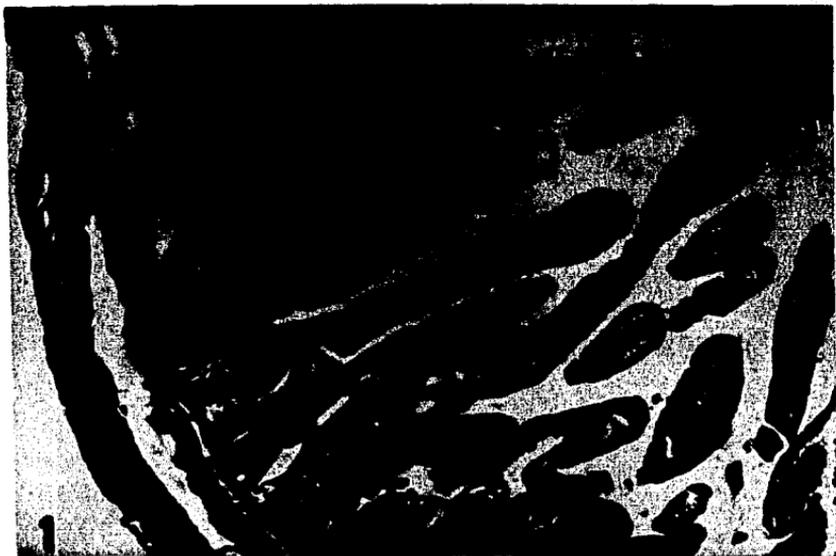
Foto # 4: Microfotografía de 2 células intestinales de un cerdo infectado por G.E.T. Note los virus en la superficie de una célula (V). Note el número y longitud de las microvellosidades (MC) membrana de separación entre dos células (M). X 10 000.

Foto # 5: Microfotografía a mayor aumento de las microvellosidades (MC) con virus (V) en su superficie. Cuando se estudian preparaciones con tinciones negativas, los coronavirus permiten ver su corona solar. Con la metodología de cortes incluidos en resinas epoxy, como fue el caso del material aquí usado, la corona solar no es visible en su totalidad. X 130 000.

Foto # 6: Microfotografía de una célula intestinal de fleón de lechón infectado con la G.E.T. Note la pérdida de las microvellosidades (MC) formación de vesículas (VE) en la zona apical que sugieren la incorporación de partículas virales y su disolución en la fase de eclipse. X 60 000.

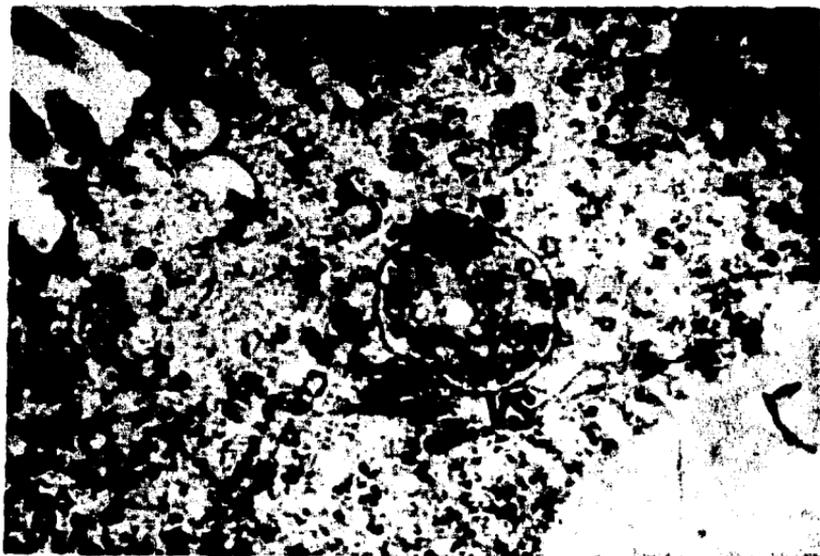
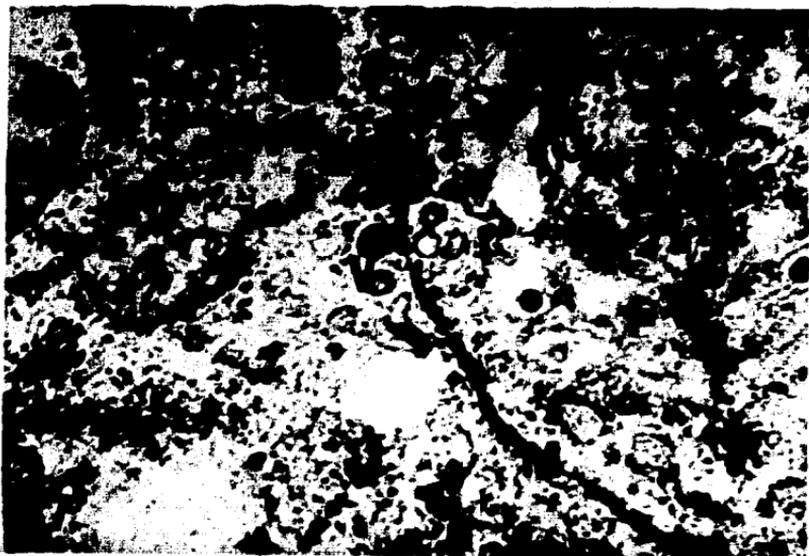
Foto # 7: Microfotografía electrónica de dos células epiteliales; las membranas citoplásmicas de ambas células (M) muestran partículas virales de coronavirus en maduración (V) X 130 000.

Foto # 8: Microfotografía electrónica que presenta una vesícula intra citoplásmica viral (VS), note las partículas virales en fase de maduración. X 100 000.









CONCLUSION Y DISCUSION

Brown y Gordon en 1970, sugieren que el mecanismo de acción del isoprinosine se ejerce sobre los ribosomas del hospedador, alterándolo de tal forma que hace ineficaz el ARN mensajero del virus. Hay cierta similitud de acción con la del interferón, pudiendo pensarse que ésta droga pertenece al grupo de los que inducen la producción de este elemento propio de la célula o que representa un equivalente sintético del mismo (Gordon y Ronsen, 1970a, Ponzoni, 1971). El Isoprinosine marcado con C14, muestra una vida media en el suero de 3 horas y se excreta por la orina rápidamente (Settineri y col. 1974).

El Isoprinosine ha sido utilizado recientemente en diferentes padecimientos humanos virales como Sarampión Hepatitis, Herpes Zoster y Herpes simple, con resultados halagadores (Ink, 1971, Muñarro y col. 1973, Ahumada y col. 1972, Stenberg y Macotela, 1972). En animales se ha probado en la influenza del ratón, fibroma viral y queratitis herpética en conejos con buenos resultados (Glasky y col. 1971, Chang y Weinstein, 1973, Ink, 1970). Aunque también se han obtenido resultados contradictorios en las siguientes enfermedades: encefalomiocarditis viral, herpes virus hominis tipo 2 y rabia en ratones; viruela en conejos. rinotraqueitis y panleucopenia en gato. moquillo en hurones. influenza y gastroenteritis transmisible en el cerdo aulesky en ratones (Glasgow, 1972, Ink, 1971, Estrada y col., 1979, Nazara y col. 1979).

En cultivo de tejidos el Isoprinosine ha probado tener efectividad reduciendo el número de partículas virales tanto de virus ARN, tales como

polio, influenza A₂ Honk Kong e influenza APR₈). En virus del tipo ADN como adenovirus y herpes virus (Gordon y Brown, 1971, Gordon y Ronsen 1970 b, Chang y Weinstein 1973 y Muldoon, 1972).

Recientemente Hernández Jáuregui y colaboradores realizaron un estudio utilizando células de riñón de hamster en cultivo de tejidos inoculados con virus rábico y estudiaron la interacción del Isoprinosine con este virus.

Los resultados indican que utilizando metodologías variadas, como inmunofluorescencia, titulación de virus y microscopía electrónica el número de células infectadas se reduce en aquellos grupos de células tratados con Isoprinosine. El número de vesículas conteniendo virus en replicación, el número de matrices virales, así como el número de virus madurando en membranas citoplásmicas, se encontraron también reducidos en aquellos grupos tratados con Isoprinosine. El título del virus también se encontró disminuído en aquellos grupos tratados con la droga, reduciéndose hasta dos logaritmos a las 24 y 48 horas respectivamente (Hernández Jáuregui, 1979).

Es un hecho que clínicamente los resultados de éste experimento no fueran satisfactorios. Es probable que la velocidad de replicación del virus de la G.E.T. (4 a 6 horas) haga que el número de virus presentes en la luz intestinal y en las células de absorción del epitelio sea numeroso y permitan demostrar las manifestaciones clínicas.

Otra posibilidad es que el Isoprinosine no sea metabolizado por la célula de absorción intestinal, lo que daría como resultado que el efecto antiviral no se presentara. Como en todo trabajo de tipo farmacológico, sería necesario repetir este experimento varias veces llevando al cabo diferentes curvas de dosis-respuesta.

Para el tratamiento de la G.E.T. no se contempla en la actualidad sino la terapia de tipo inmunológica, la cual da resultados variables sin embargo de cierta efectividad.

REFERENCIAS

1. Ahumada Padilla, M., Amézquita, D. y Biro, C.E.: Evaluación clínica de la Isoprinosina en herpes simple y herpes zona. El Médico, agosto, 1972.
2. Bay, W.W.: Transmissible gastroenteritis in swine field herd studies. J. Am. Vet. Med. Assoc. 120: 283, 1952.
3. Bohl, E.H., Easterday, B.C., Haelterman, E.O., McClurkin, A. W., Ristic, M. y Tamoglia, T.W.: Report of subcommittee on transmissible gastroenteritis in swine. Proc. U.S. Animal Health Assoc. 73: 358, 1969.
4. Brown, E.R., Gordon, P.: Inosine-alkylamino alcohol complexes: anti-viral actions (abstract) Fed. Proc. 29: 684, 1970.
5. Chandler, R.L., Derbyshire, J.B. y Smith, K.: Observations on the experimental infection and cellular pathology of transmissible gastroenteritis in piglets. Rev. Vet. Sci. 10: 435, 1969.
6. Chang, T.W., Weinstein, L.: Antiviral activity of isoprinosine in vitro and in vivo. Am. J. Med. Sci. 265: 143-146, 1973.
7. Doty, B. y Gordon, P.: Complejos de inosina-alkilaminoalcoholes. Incrementación del aprendizaje de preservación en ratas. Fed. Proc. 29, 684 Abs. 1970. North Central Col. Maperville 111 and Chicago ME. Sch., Chicago, Ill. 60612.
8. Doyle, L.P. y Hutchings, L.M.: A transmissible gastroenteritis in pigs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 108: 257, 1946.
9. Estrada Correa, A., Morales, C.M. y Morilla González, A.: Evaluación de la droga Isoprinosine en el tratamiento de la gastroenteritis transmissible de los lechones (G.E.T.) XI Congreso Nacional de Microbiología, p. 67, 1979. Zapopan, Jalisco, México.
10. Glasgow, L.A. y Galasso, G.J.: Isoprinosine: Lack of antiviral activity in experimental model infections. J. Infec. Dis. 126: 162-169, 1972.
11. Glasky, A.J., Settineri, R. y Lynes, T.E.: Isoprinosine: Therapeutic antiviral action against influenza A₂ in the mouse. Special Print from Advances in Antimicrobial and Antineoplastic Chemotherapy. Proc. VIIth. International Congress of Chemotherapy, Prague, 1971.

12. Glauert, A.M., Glauert, R.H.: Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 191, 1958.
13. Gordon, P., Brown, E.R.: Isoprinosine: novel biochemical basis for antiviral action. In *Advances in Antimicrobial and Antineoplastic Chemotherapy*. Proc. 7th Int. Cong. Chem. Prague, 1971.
Bol. Med. Univ. Park Press 1: # 2, 1247-1250, 1972.
14. Gordon, P., Ronsen, B.: Inosine-alkylamino alcohol complexes: enhancement of polyribosome function. *Fed. Proc. Abstr.* 19: 684, 1970.
15. Haelterman, E.: Transmissible gastroenteritis of swine. *Proc. World Vet. Congr.* 17: 615, 1963.
16. Haelterman, E.O.: On the pathogenesis of TGE of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 160: 534-542, 1972.
17. Hancock, B.B., Bohl, E.H. y Birkeland, J.M.: Swine kidney cell cultures - Susceptibility to viruses and use in isolation of enteric viruses of swine. *Am. J. Vet. Res.* January 127-132, 1959.
18. Harada, K., Kumagi, T. y Sasahara, J.: Cytopathogenicity of transmissible gastroenteritis virus in pigs. *Natl. Inst. Anim. Hlth. Quart* 3: 166, 1963.
19. Hernández Jáuregui, P., González Vega, D. y Hernández Baumgarten, E.: Interacción del Isoprinosine con el virus rábico en cultivo de tejidos. XI Congreso Nacional de Microbiología, p. 65, 1979. Zapopan, Jalisco, México
20. Hooper, B.E. y Haelterman, E.O.: Growth of transmissible gastroenteritis virus in young pigs. *Am. J. Vet. Res.* 27: 286, 1966a.
21. Hooper, B.E. y Haelterman, E.O.: Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 149: 1580, 1966b.
22. Ink, J., Antonini, M.G.: NPT 10.381, agente terapéutico de virosis. *Pren. Univ.* 324: 6121, 1970.
23. Ink, J., Andres, F.J., Antonini, G.M., et al: El NPT 10.381 agente antivirósico. Estudio clínico bioestadístico. *Pren. Med. Arg.* 57: 1050-1064, 1971.

24. Lee, K.M.: Propagation of transmissible gastroenteritis virus in tissue culture. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 66: 191-195, 1956.
25. Mattisson, A.G.M. y Karlsson, B.J.: Observations on structure of intestinal epithelial cells in newborn piglets. *Proc. Scand. Elec. Microsc. Soc. (abs.)* p. 243, 1957.
26. Millonig, G.: Further observations on phosphatase buffer for osmium solution in fixation. In *Proceeding 5th. Internat. Cong. Electron Microscopy 2, Philadelphia, Pa.* p. 8, 1962.
27. Miñarro, A., Linfate, E., Momesso, S., Rossi, A., Bienaimée R., Gregorio, V. y Sessa, R.: Resultados obtenidos con el empleo de un antivirósico (NP 113) en diversas afecciones virales en Pediatría. *Semana Médica* 143: # 12, 363-372, 1973.
28. Muldoon, R.L. Mezny, L.C.: The antiviral activity of isoprinosine against some respiratory viruses (abstract). *Antimicrob. Agents Chemother.* 1971: 29, 1972.
29. Nazara, S., Martell, M., Oros, D.: Evaluación del Isoprinosine, vitamina A y suero de cerdos convalecientes en el tratamiento de la enfermedad de Aujeszky en ratones. XI Congreso Nacional de Microbiología. p. 66, 1979. Zapopan, Jalisco, México.
30. Noble, W.A.: Methods used to combat transmissible gastroenteritis. *Vet. Rec.* 76: 51, 1964.
31. Olson, D.P., Waxler, G.L. y Roberts, A.W.: Small intestinal lesions of transmissible gastroenteritis in gnotobiotic pigs: A scanning electron microscopic study. *Am. J. Vet. Res.* 34: 1239-1245, 1973.
32. Ponzoni, C.: *Ressegna*, 1971, 4:2.
33. Reynolds, E.: The use of lead citrate at high Ph as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208, 1963.
34. Sabatini, D.D., Bensch, K. y Bennett, R.J.: Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17: 19-58, 1964.
35. Setteneri, R.A., Friebertshauer, G.E., Pfadenhauer, E.H. y Ginsberg, T.: Analysis of antiviral effects of isoprinosine in tissue culture animals and man. *Pacific Slope Biochemical Conference*, 1974. p. 46. Riverside, California.

36. Staley, T.E., Jones, E.W., Corley, L.D.: Fine structure of duodenal absorptive cell in the newborn pig before and after feeding colostrum. *Am. J. Vet. Res.* 30: 567-580, 1969.
37. Stenberg, T. y Macotela, R.E.: Tratamiento de Herpes Zoster y Herpes simples con Isoprinósina. *Prensa Med. Mex.* 37: 158-159, 1972.
38. Tajima, M.: Morphology of transmissible gastroenteritis virus of pigs. A possible member of coronaviruses. *Arch. Ges. Virusforsch.* 29: 105, 1970.
39. Thake, D.C.: Jejunal epithelium in transmissible gastroenteritis of swine. An electron microscopic and histochemical study. *Am. J. Pathol.* 53: 149, 1968.
40. Wagner, J.E., Beamer, P.D. y Ristic, M.: Electron microscopy of intestinal epithelial cells of piglets infected with a transmissible gastroenteritis virus. *Can. J. Comp. Med.* 37: 177, 1973.
41. Wallas, L.J. y Whitehair, C.K.: Influence of porcine transmissible gastroenteritis on chlortetracycline blood levels. *J. Am. Vet. Res. Assoc.* 147: 952, 1965.
42. Watson, M.L.: Staining of tissues sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Cytol.* 4: 475, 1958.
43. Waxler, G.L.: Lesions of transmissible gastroenteritis in the pig as determined by scanning electron microscopy. *Am. J. Vet. Res.* 33: 1323, 1972.
44. Whitehair, C.K., Grummer, R.H., Phillips, P.H., Bohstedt, G. y Mc Nutt, S.H.: Gastroenteritis in pigs. *Cornell Vet.* 38: 23, 1948.