



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**EFFECTO DE LA FLUMETASONA EN
RATONES RECIEN NACIDOS INFECTADOS
CON VIRUS COXSACKIE**

T E S I S

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

p r e s e n t a :

Margarita Concepción Torres

López



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

..... A MAMA

..... A ADOLFO

..... A ADOLFITO

Agradezco infinitamente la colaboración
de las siguientes personas para la rea-
lización de este trabajo:

Dr. Salvador Martín Sosa

M.V.Z. Armando Mateos

Dr. Juan Garza Ramos

M.V.Z. Jorge Domínguez

Dra. Aline S. de Alhuja

Sra. Carmen Zamora

Sr. Juan José Ortiz

PRESIDENTE, Prof. MAGDALENA ACOSTA SEGURA
VOCAL " LEONOR MARTINEZ SOTO
SECRETARIO " SALVADOR MARTIN SOSA
1er. SUPLENTE " LIBRADO ORTIZ ORTIZ
2o. SUPLENTE " MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA

El presente trabajo fué realizado en: EL LABORATORIO DE VIROLOGIA DEL DIF (DESARROLLO INTEGRAL DE LA FAMILIA) Y EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM.

Sustentante: MARGARITA CONCEPCION TORRES LOPEZ

Asesor: DR. SALVADOR MARTIN SOSA

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	1
Capítulo I.- GENERALIDADES	
- Virus Cocksackie.	3
- Patogenicidad de los virus Cocksackie A en ratones lactantes.	6
- Patogenicidad de los virus Cocksackie B en ratones lactantes.	7
- Defensas de los vertebrados hacia las infecciones virales.	8
- Corticosteroides.	11
Capítulo II.- MATERIAL	
- Biológico	17
- Soluciones y otros materiales.	17
Capítulo III.- METODOS	
- 1a. Parte.- Determinación del período de incubación de los virus Cocksackie A ₃ y B ₁ en el ratón recién nacido.	19
- 2a. Parte.- Efecto de los inó- culos en ratones recién naci- dos.	21
- 3a. Parte.- Procesamiento de órganos.	22
Capítulo IV.- RESULTADOS	
- Criterios para la evaluación semicuantitativa de las altera <u>a</u> ciones histopatológicas.	25

	Pág.
- Cuadros de resultados.	29
Capítulo V.- DISCUSION Y	42
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	46

INTRODUCCION

La necesidad de diagnósticos acertados y rápidos en el laboratorio virológico ha propiciado el desarrollo de técnicas -- nuevas con las cuales se obtengan mejores resultados.

Los virus Coxsackie producen varios tipos de padecimien---tos, entre los cuales la miocarditis puede resultar mortal en -- niños pequeños. También son capaces de causar pleurodinia, her--pangina, meningitis aséptica y hasta cuadros de tipo respirato--rio.

El diagnóstico por el laboratorio se realiza aislando el - virus o bien por métodos serológicos. El aislamiento de virus - del grupo Coxsackie presenta dificultades por la escasa suscep--tibilidad de la mayor parte de los cultivos celulares, por lo - cual debe recurrirse a la inoculación de ratones recién naci---dos, los que constituyen el mejor sustrato para la replicación de estos virus.

En el ratón recién nacido, el período de incubación de ca--da serotipo de virus Coxsackie es relativamente constante, pero si puede reducirse, entonces el diagnóstico de la enfermedad se --rá mas rápido. Los padecimientos causados por estos virus en el ratón recién nacido son caracterfsticos e identificables histo--lógicamente.

Una forma de exacerbar la actividad patógena del virus e - inducir una enfermedad rápida en el ratón lactante, y por tanto un diagnóstico acelerado, es el uso de glucocorticoides, los -- que disminuyen las defensas de los ratones lactantes y de ahí - que los virus los afecten más fácilmente.

El objetivo de este trabajo ha sido observar el efecto que produce el glucocorticoide Flumetasona a nivel histológico en -

ratones lactantes inoculados con dos tipos de virus Coxsackie: A_3 y B_1 , y determinar si se acorta el período de incubación del virus como consecuencia de tal efecto y es por tanto posible -- acelerar el diagnóstico de la enfermedad.

CAPITULO I
GENERALIDADES.

Virus Coxsackie.

Los virus Coxsackie, junto con los poliovirus y los virus - ECHO son enterovirus pertenecientes al grupo de los Picornavi--- rus. Estos son los virus ARN más pequeños y su cápside posee si- metría icosaédrica, con sesenta unidades estructurales. En el - cápside aparecen tres tipos de polipéptidos y otro en su nucleoi de. El ARN viral es un solo filamento con un peso molecular de - 2.6 millones. (1)

Los virus Coxsackie no se inactivan con solventes orgánicos como el éter, presentan resistencia a antibióticos y detergen--- tes, pero se destruyen con formaldehído, yodo y cloro. Son resis--- tentes en un rango de pH de 4 a 8.5. Calentando a 50°C por treín ta minutos se destruye la infectividad del virus. La presencia - de $MgCl_2$ 1M protege al virus de inactivación térmica a 50°C por una hora. Los virus se preservan a -20°C y en 50% de glicerol a 4°C por varios años, pero pierden alguna infectividad si se lio- filizan.

Los virus Coxsackie son rápidamente inactivados con luz ul- tra violeta. (2)

Algunos virus Coxsackie pueden cultivarse en tejido de ri-- ñón de mono, riñón humano embrionario o de fibroblastos de ori-- gen humano, aunque en general es bastante difícil cultivarlos in vitro.

Los virus Coxsackie se replican en el citoplasma de la célu la huésped y pueden causar la formación de vacuolas citoplasmáti cas. El efecto citopatogénico en cultivos celulares, cuando se - logran cultivar, causa redondeamiento y picnosis de las células,

las cuales se vuelven refráctiles y se desprenden de la superficie del vidrio.

Los virus Coxsackie se dividen en dos grupos: A y B, según sean los efectos que causen en los ratones lactantes.

Los seis serotipos del grupo B comparten un antígeno común fijador del complemento, mientras que algunos de los veinticuatro serotipos de A están relacionados antigénicamente.

Las reacciones cruzadas ocurren entre los tipos A₅ y A₈, A₇ y A₁₄, A₆ y A₁₂ y, A₁₅ y A₁₇. (2)

Los tipos A₂₀, 21 y 24, y B₁, 3, 5, y 6 aglutinan eritrocitos del grupo 0 a 45°C. (3)

Patogenicidad en el ser humano.

Al igual que otros enterovirus, los virus Coxsackie se multiplican primero en la faringe y luego en el intestino delgado. La viremia es la forma de diseminación del virus a otros tejidos, y la inmunidad adquirida frente a estos virus es tipo-específica y de larga duración.

En el hombre, el período de incubación de las infecciones provocadas por el virus Coxsackie oscila entre dos y nueve días, cada virus de este tipo presenta entidades morbosas prácticamente distintas, pero un mismo tipo de virus puede producir enfermedades diferentes y una misma enfermedad o cuadro clínico puede ser ocasionada por tipos diferentes de virus Coxsackie.

Los virus Coxsackie ocasionan las siguientes enfermedades en el ser humano:

A).- Faringitis vesicular o herpangina: Consiste en la formación de lesiones vesiculares discretas y más o menos características en paladar, úvula, amígdalas y lengua; el cuadro clínico va acompañado de vómito y dolor abdominal, anorexia, disfagia

y faringe hiperémica. La enfermedad cura espontáneamente y es -- más frecuente en niños pequeños; la producen algunos virus del -- grupo A.

B).- Pleurodinia (mialgia epidémica o enfermedad de Forn--- holm): Es provocada por algunos virus del grupo B; aparecen fiebre y dolor simultáneamente, con anorexia, cefalea y dolores mus--- culares generalizados, sobre todo en músculos del tórax y abdo--- men. La enfermedad es de curso limitado y la recuperación es se--- gura.

C).- Meningitis aséptica: Este síndrome es provocado por vi--- rus Coxsackie B₁ a B₆ y A₇, A₉ y A₂₃. Los primeros síntomas comu--- nes son fiebre, jaqueca, náusea y dolor abdominal; luego aparece rigidez de nuca o espalda como signo de irritación meníngea, uno o dos días después. Aumenta el número de leucocitos en líquido - cefalorraquídeo, con ligera elevación de proteínas. La infección por virus Coxsackie A₉ o A₂₃ va acompañada frecuentemente por un exantema maculopapular. Rara vez se produce parálisis; sin embar--- go ésta se ha presentado posteriormente a la meningitis asépti--- ca, pero es pasajera y sin consecuencias.

D).- Miocarditis: La miocarditis es causada por los virus Cox--- sackie tipos B₁ a B₆ y por los tipos A₄ y A₁₄. Esta enfermedad - causa un alto porcentaje de mortalidad y afecta principalmente a niños pequeños; se observa disnea, cianosis y taquicardia. El vi--- rus se localiza en miocardio, endocardio y líquido pericárdico. Después de la fase aguda de la enfermedad, una porción significa--- tiva de los pacientes que sobreviven desarrollan mal funciona--- miento cardíaco por el resto de su vida.

E).- Catarros comunes: Se han asociado a los virus A₁₀, --- A₂₁, A₂₄ y B₃.

Las alteraciones patológicas que producen los virus Coxsackie

ckie en ratones lactantes son características y han sido utilizadas como clave para su clasificación, así como para hacer diagnósticos de padecimientos humanos. Los hallazgos histopatológicos son específicos y son los que permiten hacer diagnósticos -- más precisos.

Patogenicidad de los virus Coxsackie A en ratones lactantes:

El ratón infectado con virus del grupo A presenta parálisis después de un período de debilidad muscular, sus extremidades -- son pesadas e inmóviles y la muerte se presenta en breve, posiblemente por la parálisis de los músculos respiratorios. En ratones inoculados intraperitonealmente se ha encontrado herniación de la pared abdominal. La inoculación local en músculo produce -- degeneración muscular. Los animales que sobreviven más de una semana presentan rayas blanquecinas en sus músculos. (3)

Histológicamente se observa degeneración y destrucción de -- músculo estriado, así como miositis generalizada en todos los -- músculos, aun los no inoculados. (4) Este proceso se inicia con pérdida del límite de las fibras musculares, degeneración hialina, fragmentación y deformación, hinchamiento de miofibrillas y pérdida completa de estructura interna, así como necrosis y colapso del sarcolema. (3,5)

Aparecen zonas perinucleares densas formadas de nucleoproteína. Se observan mioblastos y leucocitos neutrófilos, y posteriormente linfocitos, histiocitos y monocitos. Aparece también -- necrosis grasa. (3)

Suele encontrarse miocarditis caracterizada por la infiltración de neutrófilos y posteriormente monocitos. (6,7)

Patogenicidad de los virus Coxsackie B en ratones lactantes.

El ratón inoculado presenta temblores, parálisis espástica y espasticidad. En la disección es raro observar signos de necrosis muscular, pero pueden presentarse cambios en el tejido liso intercapsular (panículo adiposo). La degeneración de los músculos estriados después de la infección con virus del tipo B es característicamente local y limitada. Histológicamente, se encuentran fibras nerviosas musculares periféricas y placas motoras -- mostrando degeneración nodular.

El cerebro puede aparecer reblandecido, la materia gris cambia de color y la blanca pierde su apariencia granulosa fina, desaparece la línea usual que separa la materia blanca de la gris, aparece licuefacción y desintegración del área isquémica. Microscópicamente se observa trabeculación de vasos rodeados por una barrera de glía. (8,9,10). La lesión cerebral que se presenta en un 85 % de los ratones inoculados intracerebralmente, pero sólo en un 25 % de los ratones inoculados intraperitonealmente, se inicia con cambios y ruptura de los vasos sanguíneos de la corteza cerebral. La necrosis aparece simultáneamente en muchos focos y la encefalomalacia se desarrolla rápidamente. (7) Se ha observado degeneración de las neuronas motoras.

La lesión de la grasa de hibernación o grasa café, se inicia con una degeneración celular, con franca necrosis y depósito de sales de calcio. (8,7)

En el corazón se han encontrado lesiones ocasionadas por B₄ y menos frecuentemente por B₁, tales como necrosis, degeneración hialina y obstrucción aurículo-ventricular. (10)

La hepatitis producida por el grupo B llega hasta franca hemorragia hepática y gastrointestinal, estas lesiones son en general de escasa amplitud y consisten en pequeñas zonas de degenera

ción y aun necrosis de células parenquimatosas. (11,12)

En el páncreas se han encontrado áreas focales de necrosis y hemorragia a través del tejido acinar, la infiltración neutrofilica y de linfocitos; aparece nucleo picnótico en las células de los islotes de Langerhans, así como algunos linfocitos. (12, 13)

Las lesiones más útiles para el diagnóstico son: degeneración de la grasa de hibernación, encefalomalacia, y en menor -- grado: hepatitis, miocarditis y necrosis de tejido acinar del páncreas.

Datos generales de la cepa Coxsackie A₃.

Aislada en el Laboratorio Estatal de Albany, New York, E.U. A. en 1948, de heces de un niño de dos años que sufría de una meningitis aséptica. La cepa prototipo (Olson) ha sido pasada por ratón lactante. El virus Coxsackie A₃ presenta reacción cruzada con el suero anti-Coxsackie A₈.

Datos generales de la cepa Coxsackie B₁.

Aislada en la Universidad de Yale, New Haven, Conn. E.U.A., en 1949, de un caso diagnosticado como poliomiелitis no paralítica. La cepa prototipo (Connecticut 5) ha sido pasada por ratón - lactante. (2,13)

Defensas de los vertebrados hacia las infecciones virales.

De las cinco principales clases de inmunoglobulinas IgG, -- IgM, IgA, IgD e IgE, se sabe con certeza que las tres primeras - juegan un papel importante en la patogénesis de las infecciones virales, y acaso también la IgE.

La IgG y la IgM se encuentran principalmente en la sangre y

fluídos extracelulares; la IgA se encuentra también en secreciones glandulares y en las superficies mucosas.

Los anticuerpos producidos contra infecciones virales y que tienen capacidad neutralizante, son los dirigidos contra aquellos antígenos que se encuentran en la superficie del virión, y que están asociados principalmente con la absorción del antígeno a la célula.

La reacción antígeno viral-anticuerpo no es irreversible, - ya que puede disociarse por elución o bien con tratamientos físicos o químicos, como pH alto o bajo, fluorocarbono o vibraciones sónicas.

Se cree que los anticuerpos neutralizantes no permiten la absorción de los viriones a las células por obstáculo estérico; los anticuerpos adheridos por ambos sitios de unión en la superficie del virión, pueden distorsionar la configuración de la envoltura viral y no permitir los procesos normales de adhesión y desenvolvimiento, o no permitir la entrada de nucleasas o de algunas otras enzimas a la partícula viral.

Existen diferencias importantes entre la respuesta de anticuerpos de los animales a la primera exposición al antígeno y a las exposiciones subsecuentes. En general, la introducción parenteral de un antígeno en un animal no tratado previamente, es seguida por la fase inductiva, que puede durar de uno a siete días o más dependiendo de la naturaleza, de la dosis del antígeno y de la especie animal. A esto sigue la producción de una cantidad limitada de anticuerpos, principalmente macroglobulinas (IgM). Con la reinoculación del antígeno ocurre una respuesta secundaria que consta de: a) período de inducción más corto, declinación más lenta subsecuente a la síntesis de anticuerpos y b) producción de grandes cantidades IgG así como IgM.

En infecciones generalizadas se produce IgG en bazo y ganglios linfáticos, durante un período en que la respuesta cambia de tipo primario a secundario. Existe además una gran producción de IgG circulante que continúa siendo sintetizada por un tiempo variable.

Las infecciones superficiales de los aparatos respiratorio o intestinal pueden producir localmente IgA pero poca IgG circulante. La IgA es sintetizada en menor grado en bazo y en ganglios linfáticos, y puede pasar en forma de dímero a través de células epiteliales de las membranas mucosas a su superficie sólo después de la adquisición de una "pieza de transporte" (una glucoproteína muy distinta de los polipéptidos de las inmunoglobulinas) probablemente en las células epiteliales.

En las infecciones virales generalizadas, las reinfecciones abortan antes de la producción de síntomas porque ocurre la respuesta anamnésica rápida durante el período relativamente largo de la incubación. La repetición de infecciones no reconocidas desempeña un papel probablemente esencial en el mantenimiento de una inmunidad activa.

En la naturaleza, la inmunidad pasiva se debe a la transferencia de anticuerpos de la madre a la progenie. La presencia de IgA en el calostro o en la leche puede ser importante si produce inmunidad local (intestino) en los animales recién nacidos.

En el hombre las IgG, son fácilmente transportadas a través de la placenta y proporcionan inmunidad congénita contra la mayoría de las infecciones virales generalizadas, por algunas semanas o meses.

Resistencia no inmunológica.

Fagocitosis.

Los macrófagos, principalmente los del sistema retículo endotelial, y las células fagocíticas similares vigilan la linfa, las cavidades pleural y peritoneal, el aparato respiratorio y el tejido conjuntivo de todo el cuerpo.

La capacidad protectora de los macrófagos puede actuar en la mayoría de las etapas de la progresión escalonada de las infecciones generalizadas y puede tener, por tanto, gran importancia en la frecuencia y extensión de gran número de dichas infecciones.

Los macrófagos circulantes (monocitos de la sangre), pueden transportar virus alrededor del cuerpo; sin embargo, pueden producir considerables cantidades de interferón y por lo tanto proteger a las células susceptibles de infección.

Interferón.

El interferón es la más común y más importante respuesta no inmune de las células de los vertebrados a la infección viral. - El interferón inhibe la multiplicación de los virus, y cuando es eliminado por las células infectadas, protege de la acción viral a las células no infectadas. El interferón muestra especificidad celular pero no viral, actúa induciendo la formación de la proteína inhibidora de la traducción del ARN_m viral, pero no afecta el ARN_m celular. (1)

Corticosteroides.

La corteza suprarrenal secreta un grupo de hormonas denominadas corticoesteroides; éstos se dividen en tres tipos principales de hormonas: mineralocorticoides, glucocorticoide y corticoi

des androgénicos.

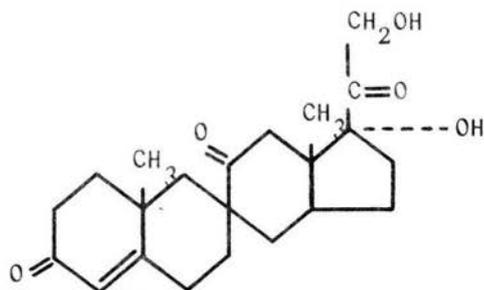
Los mineralocorticoides actúan sobre los electrolitos de los líquidos extracelulares, en particular sodio, potasio y cloruros. Como ejemplos tenemos: aldosterona y desoxicorticosterona. (16)

Los glucocorticoides elevan la concentración de glucosa en la sangre y actúan sobre el metabolismo de lípidos y de proteínas. (15) Como ejemplo de éstos tenemos la cortisona y la hidrocortisona.

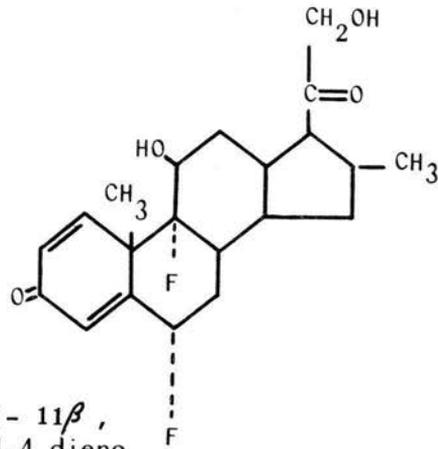
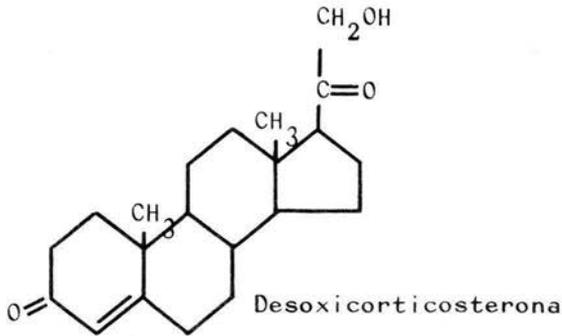
Los corticoides androgénicos, producen efectos similares a la hormona sexual masculina testosterona. Como ejemplo podemos citar a la androsterona. (16)

Los corticosteroides son indispensables para el mantenimiento homeostático del organismo y una alteración de su contenido en el cuerpo produce trastornos que modifican el funcionamiento regular de éste.

La estructura básica de estas hormonas es la de la cortisona, y la estructura de otros corticosteroides se forma por el desplazamiento de hidrógenos e hidroxilos y aumento de radicales sobre el núcleo básico.



Cortisona



Flumetasona

- 6 α , 9 α difluoro- 16 α - metil- 11 β ,
17 α , 21 thihidroxi- preña- 1,4 dieno
3, 20 - diona (17, 18)

Los corticosteroides sintéticos producen acciones farmacológicas semejantes a las de los naturales. Se ha encontrado que -- ciertas dosis de glucocorticoides tanto sintéticos como natura-- les disminuyen la respuesta inflamatoria normal de los tejidos. (15, 16, 19)

La potencia antiinflamatoria de los glucocorticoides es muy variada según puede verse:

Potencia antiinflamatoria	Glucocorticoide
120	Flumetasona
50	Dexametasona
10	9 fluoroprednisolona acetato
1	Hidrocortisona (14,20)

Para comprender mejor la acción antiinflamatoria de estos esteroides es conveniente revisar brevemente el proceso inflamatorio.

El proceso inflamatorio se lleva a cabo a través de tres etapas:

1) Escape de gran cantidad de líquido parecido al plasma, que sale de los capilares hacia el área lesionada. El flujo sanguíneo aumenta por la vasodilatación de arteriolas, venas y capilares; el control del calibre de los vasos se lleva a cabo por terminaciones nerviosas sensoriales y por metabolitos celulares que tienen acción dilatadora. El flujo sanguíneo aumenta porque existe un gradiente de presión al haber vasodilatación, pero posteriormente disminuye porque al salir el plasma la concentración aumenta la presión del flujo y lo hace más lento. El plasma está formado de exudado y proteínas; el exudado diluye los metabolitos tóxicos bacterianos y contiene opsoninas que hacen al microorganismo susceptible de fagocitosis. La cantidad de glóbulos rojos aumenta y desplaza a los blancos hacia la periferia de los vasos, donde se adhieren a las paredes y éstas aumentan su permeabilidad permitiendo el paso de leucocitos, (6,7)

2) Infiltración del área por leucocitos; los neutrófilos son

los primeros en emigrar en masa en infecciones bacterianas, pero en infecciones virales aparecen monocitos, linfocitos y algunas veces histiocitos del tejido conectivo que refuerzan la acción de los monocitos.

El movimiento leucocitario ocurre por la existencia de un potencial eléctrico, pero principalmente se debe a un gradiente químico de concentración. También una sustancia llamada leucotaxina (existente en el exudado) atrae a los leucocitos. Ciertos productos de la digestión de células de los tejidos "atraen" leucocitos (se ha visto que son adenil derivados del ácido nucleico); las bacterias mismas crean un quimiotropismo de los leucocitos, los cuales las fagocitan. (21,24)

3) Crecimiento de tejido fibroso: el aumento de permeabilidad vascular hace que escape fibrinógeno del plasma, y la fibrina restringe el paso de microorganismos pero permite el paso a otros fluidos y cierra las heridas, cicatrizándolas. (6,15)

El efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides consiste en:

a) Estabilización de la membrana de los lisosomas celulares de macrófagos, evitando así la destrucción por enzimas (nucleasas, ácido fosfatasa y beta glucuronidasa) (22) de los agentes infectantes.

b) Disminución de la formación de bradicina, sustancia vaso dilatadora muy potente, que se produce en los tejidos inflamados. Esta sustancia es liberada de una alfa globulina, por la enzima proteolítica calicreína; la estabilización de la membrana de los lisosomas impide la liberación de calicreína. (6,23)

d) Depleción del tejido linfoide, reducción del peso de bazo y timo, disminución del tamaño de los ganglios linfáticos y ausencia en ellos de linfocitos. (25)

d) Inhiben la producción de interferón inducido por virus en embrión de pollo y cultivo de tejidos. (26)

e) Disminución de la producción de células plasmáticas, reducción de la respuesta primaria de IgG y ligeramente de IgM. -- (27) Esto se piensa que es a nivel de producción de anticuerpos porque cuando se administra suero inmune el efecto del glucocorticoide es nulo. (28)

f) Inhibición de la síntesis de ADN y ARN, y de la mitosis celular. (14)

Por su acción antiinflamatoria, los glucocorticoides son -- frecuentemente usados en el tratamiento de artritis reumática, -- en operaciones oculares, en reacciones alérgicas de hipersensibilidad o antígeno-anticuerpo, pero también se ha observado que -- cuando se usan en presencia de un agente infectante se exagera la virulencia de éste por la baja de defensas naturales que sufre el organismo. (16,14)

Flumetasona.

La Flumetasona posee una potencia 120 veces mayor que la -- hidrocortisona en la producción de eosinopenia, hiperglicemia y actividad antiinflamatoria. (17,29)

CAPITULO II

MATERIAL

A).- Material Biológico.

- Ratones lactantes de la cepa C57BL6J de un día de nacidos; estos ratones fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología de la Salud del Niño, DIF. Los ratones lactantes y sus padres se mantuvieron en óptimas condiciones de limpieza; las jaulas y la viruta eran esterilizadas y se aseaban cada veinticuatro horas. El bioterio tiene un estricto control de temperatura y de flujo de aire. La alimentación se componía de un producto comercial especial preparado (Purina Chow).

- Virus Coxsackie A₃ y B₁ proporcionados por el Laboratorio de Virología del DIF. Las cepas son cepas prototipo obtenidas de la American Type Culture Collection.

B).- Soluciones y Otros Materiales.

1.- Diluyente para las suspensiones virales: Solución salina balanceada de Hanks adicionada de 2% de mezcla antibiótica - (200 U.l. de penicilina y 200 µg. de estreptomicina por mililitro, concentración final), 0.8 % de solución de bicarbonato de sodio al 7.5 % y 2 % de suero fetal de ternera (como estabilizador de la actividad viral), estéril.

2.- Solución salina balanceada (PBS según fórmula de Dulbeco), a pH 7.5 (estéril)

3.- Flumetasona (Syntex) 0.5 mg/ml

4.- Alúmina estéril

5.- Carbonato de Litio al 1%

6.- Formaldehido al 10%

- 7.- Eter etílico
- 8.- Alcohol etílico al 50, 70, 80, 95, 96 y 100%
- 9.- Alcohol-benceno al 50%
- 10.- Alcohol-ácido al 1%
- 11.- Benceno
- 12.- Xilol
- 13.- Hematoxilina de Harris
- 14.- Eosina al 0.3%
- 15.- Parafina
- 16.- Grenetina
- 17.- Resina para montar preparaciones histológicas
- 18.- Jeringas para insulina de 1 ml (estériles)
- 19.- Agujas calibre 27, cortas (10 mm) (estériles)
- 20.- Estuche de disección (estéril)

Para evitar contaminaciones de las suspensiones virales se utilizó una campana de flujo laminar. El procesamiento de los tejidos estudiados se realizó en un aparato automático Histokinette y los cortes en un microtomo ordinario.

CAPITULO III

MÉTODOS

Primera parte.- Determinación del período de incubación de los virus Coxsackie A₃ y B₁, en ratón recién nacido.

a).- Preparación del abasto de virus.

A las veinticuatro horas de nacidos se inocularon seis ratones por las vías intracerebral, intraperitoneal y en grasa café. con virus Coxsackie A₃, y otros seis ratones con el virus - Coxsackie B₁; se utilizó una suspensión viral de infectividad - no conocida, en las siguientes dosis:

0.05 ml por vía intraperitoneal

0.02 ml por vía intracerebral

0.05 ml por grasa café

A las veinticuatro horas fueron congelados los ratones a -20°C, y al día siguiente se procedió a cosechar el virus, para readaptar la cepa al ratón lactante y para obtener más material para posteriores inoculaciones. La cosecha del virus se hizo en la forma siguiente:

Una vez descongelado cada ratón y bajo la campana estéril, se le hizo una incisión longitudinal desde el cuello hasta la sínfisis pubiana; se le separaron las vísceras y se descartaron, se retiró la piel de los miembros y se colectaron éstos -- junto con la masa encefálica, la cual se extrajo con unas tijeras finas. Miembros y masa encefálica se trituraron con 0.5 g. de alúmina estéril en un mortero pequeño, al triturado se agregaron pequeñas cantidades de solución salina balanceada, en va--

rias ocasiones, y se fue pasando el material a un tubo estéril - de centrífuga, hasta un volumen total de 5 ml. La suspensión viral se clarificó por centrifugación a 2500 r.p.m. durante 10 --- min. Del sobrenadante claro se prepararon diez alícuotas en tu-- bos pequeños, las que se llevaron a -20°C .

b).- Determinación del período de incubación de los virus.

Debido a que no se conocía el título de infectividad viral - fué necesario proceder a realizar algunas inoculaciones prelimi-- nares que permitieran establecer con un mínimo de precisión el - período probable de incubación de cada suspensión viral y defi-- nir la dilución necesaria en cada caso para obtener un período - de incubación intermedio, es decir, ni muy corto ni muy largo.

Se consideró que de esa manera sería más fácil detectar una reducción en el período de incubación, si el fármaco produce tal efecto.

Las diluciones utilizadas fueron de 10^{-1} a 10^{-10} , inoculándo se media camada por dilución y la otra media camada con solución salina balanceada sin virus, como testigos de una posible acción traumática. La patogenicidad se observó teniendo como parámetros la parálisis de miembros y falta de leche en el estómago, así como la muerte de los ratones inoculados con distintas diluciones de cada uno de los virus.

Al observar los efectos clínicos producidos por los virus se notó que el 60 % de los ratones inoculados con Coxsackie B₁ en - dilución 10^{-3} presentaban parálisis de miembros posteriores y -- falta de leche en el estómago a los tres días de inoculados.

Con el virus Coxsackie A₃ en dilución 10^{-7} se observó parálisis flácida y estómago sin leche en un 75% del número de ratones inoculados a los cuatro días de haberse aplicado el inóculo.

Segunda Parte.- Efecto en ratones recién nacidos, de:

- grupo 1.- Virus Coxsackie A₃ 10⁻⁷
- grupo 2.- Virus Coxsackie B₁ 10⁻³
- grupo 3.- Flumetasona (control)
- grupo 4.- Flumetasona + Virus Coxsackie A₃ 10⁻⁷
- grupo 5.- Flumetasona + Virus Coxsackie B₁ 10⁻³
- grupo 6.- Solución Salina Balanceada (testigos)

La dosis de Flumetasona por gramo de peso para cada animal fué proporcionada por el Departamento de Farmacología de Syntex S.A., División Agropecuaria y es de 0.00006 mg/g de peso. La -- Flumetasona (diluida 1:300 en solución salina fisiológica) se -- inoculó por vía intraperitoneal, con jeringa de insulina y aguja calibre 27, estériles, en un volumen de 0.07 ml; este volumen contenía 0.00012 mg del corticosteroide, considerando dos -- gramos como peso promedio por animal. En los grupos control y -- testigo se inocularon volúmenes similares por las vías apropiadas.

En el caso de los grupos 4 y 5, la suspensión viral diluida fué inoculada 24 horas después de haber sido inoculado el es teroide.

La inoculación de controles con Flumetasona es indispensable para descartar la posibilidad de que el esteroide cause algún efecto que pudiera confundirse con otro producido por el vi rus; los testigos se inocularon con solución salina balanceada para descartar el daño de tipo traumático causado por el inóculo como posible efecto de la Flumetasona. Además, se administraron ambas sustancias en ratones de la misma camada para que los animales estuvieran en condiciones semejantes de alimentación, alojamiento, etc.

De los grupos 1,2,3 y 6 se tomaron muestras a 1,2,3,4,5,6, 7 y 8 días de inoculados; de los grupos 4 y 5 (y sus correspondientes testigos) las cosechas se realizaron cada 12 horas, de las 12 a las 92 horas post-inoculación del virus. En este caso se tomaron muestras a intervalos más cortos para saber con exactitud en qué momento se afectaba el ratón; esta decisión fué tomada porque a veces se encontraban animales muertos a las veinticuatro horas de haberlos revisado y así ya no eran adecuados para estudios histopatológicos.

Todas estas muestras se tomaron aleatoriamente de varias -camadas inoculadas, descartando a los ratones que murieron por traumatismo.

Las muestras fueron obtenidas en la forma siguiente:

Se toma al ratón y se le coloca en un frasco pequeño tapado y con un algodón empapado de éter, hasta que muera; se abre el abdomen y el tórax pero no se le sacan las vísceras; se corta la cabeza en la región cervical sin desprenderla completamente, y así abierto se pone en formaldehído al 10 %, por cuatro -días con el objeto de que el fijador de tejidos penetre bien en los órganos que luego se procesarán histológicamente.

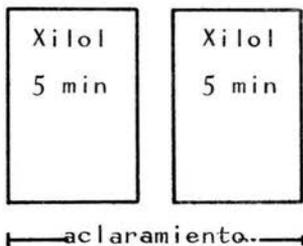
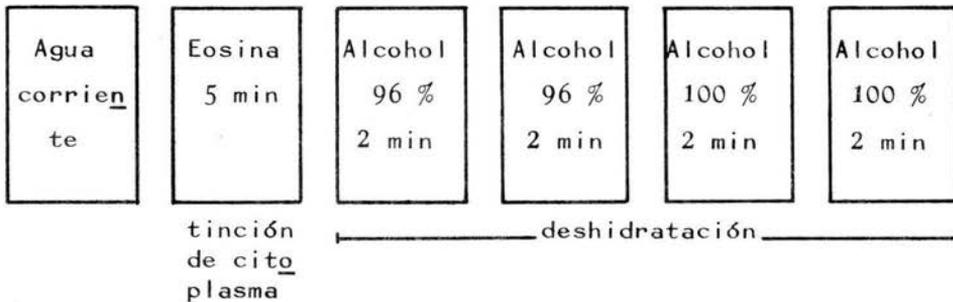
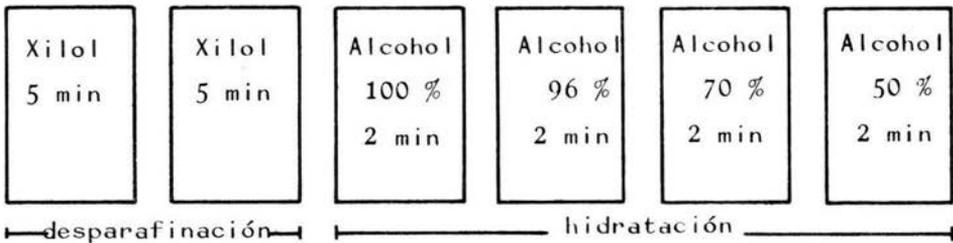
Tercera Parte.- Procesamiento de Organos.

Tomadas las muestras y al término del período de fijación, con tijeras pequeñas se extrajeron los siguientes órganos: cerebro, páncreas, hígado, músculo y corazón. Cada uno de estos órganos fué procesado de acuerdo al siguiente esquema:

	Solución	Tiempo
	Alcohol 80 %	2 horas
	Alcohol 95 %	1 hora
Deshidratación	Alcohol 95 %	"
	Alcohol 70 %	"
	Alcohol-benceno 50 %	"
	Benceno	1 hora
Aclaramiento	Benceno	"
	Benceno	"
	Parafina	2 horas
Impregnación	Parafina	"

Posteriormente, se toma cada muestra impregnada en parafina y se introduce en un baño de parafina líquida, en un molde con su respectiva identificación y se incluye en un cubo de parafina líquida que posteriormente solidifica y queda listo para cortarse en el microtomo. Se toma cada bloque y se corta hasta llegar al órgano y después se hacen cortes delgados de 5μ de espesor. - El corte se extiende en un baño de agua caliente con grenetina, se coloca en un portaobjetos, se deja escurrir por diez minutos y luego se procede a desparafinar, hidratar, colorear, deshidratar, aclarar y montar las muestras según el siguiente esquema:

(30)



Montaje

Para montar la laminilla, se limpia sin tocar el tejido, se coloca en éste una gota de resina y se cubre con un cubreobjetos.

Se procede a observar las laminillas en un microscopio de luz.

CAPITULO IV
RESULTADOS

Los períodos de incubación obtenidos en base a observaciones clínicas de parálisis de miembros y flata de leche en el estómago fueron:

4 días para Coxsackie A₃ dilución 10⁻⁷
3 días para Coxsackie B₁ dilución 10⁻³

El período de incubación determinado histológicamente es el período de tiempo, a partir de la inoculación, en el cual aparecen lesiones causadas por el virus en los tejidos, y los resultados pueden observarse en los cuadros adjuntos.

En este trabajo se revisaron los siguientes órganos: páncreas, hígado, corazón, músculo y cerebro. En hígado y hueso se detectaron cambios en la hematopoyesis, y en cerebro cambios en la gliosis, al inocular el esteroide y luego el virus.

Los criterios utilizados para evaluar semicuantitativamente las diversas alteraciones histológicas observadas; fueron los siguientes:

Hematopoyesis de tejido óseo:

4+ = hematopoyesis normal

3+ = aprox. 75 % de lo normal

2+ = aprox. 50 % "

1+ = aprox. 25 % "

Infiltración de mononucleares en ganglio:

4+ = aprox. 30 monocitos, basófilos, linfocitos y blastos
(por campo)

3+ = aprox. 22 "

2+ = aprox. 15 "

1+ = aprox. 8 "

Infiltración de mononucleares en grasa:

4+ = aprox. 25 monocitos, basófilos, linfocitos y blastos
(por campo)

3+ = aprox. 18 "

2+ = aprox. 12 "

1+ = aprox. 6 "

Infiltración de mononucleares en músculo:

4+ = aprox. 25 monocitos, basófilos, linfocitos y blastos
(por campo)

3+ = aprox. 18 "

2+ = aprox. 12 "

1+ = aprox. 6 "

Gliosis en cerebro:

4+ = aprox. 100 % de gliosis normal en un ratón recién
nacido

3+ = aprox. 80 % "

2+ = aprox. 70 % "

1+ = aprox. 60 % "

Necrosis de vasos sanguíneos con hemorragia:

- 4+ = Ruptura de más de tres vasos con hemorragia, (por preparación)
- 3+ = Ruptura de dos vasos con menor hemorragia, (por preparación)
- 2+ = Ruptura de un vaso con hemorragia, (por preparación)
- 1+ = Pequeña ruptura de vaso sin hemorragia, (por preparación)

Necrosis:

- 4+ = Tres áreas amplias cercanas a vasos rotos con pérdida de estructura celular, teñidas de eosina intensamente, (por preparación)
- 3+ = Dos áreas menos amplias cercanas a vasos rotos con pérdida de estructura celular, teñidas de eosina intensamente, (por preparación)
- 2+ = Un área cercana a vasos rotos con pérdida de estructura teñida de eosina intensamente, (por preparación)
- 1+ = Un área pequeña cercana a vasos rotos con pérdida de estructura celular, teñida de eosina intensamente, --- (por preparación)

Encefalomalacia:

- 3+ = Dos áreas de tejido rarificado sin pérdida completa de estructura, (por preparación)
- 2+ = Un área de tejido rarificado sin pérdida completa de estructura, (por preparación)
- 1+ = Pequeña área de tejido rarificado sin pérdida completa de estructura, (por preparación)

Reblandecimiento y obscurecimiento de tejido (macroscópicamente):

4+ = Area de aprox. $\frac{3}{4}$ de hemisferio cerebral, con consistencia semisólida, en tono amarillento con regiones -
obscuras

3+ = Area de aprox. $\frac{2}{3}$ de hemisferio cerebral, con consistencia semisólida, en tono amarillento con regiones -
obscuras

2+ = Area de aprox. $\frac{1}{2}$ de hemisferio cerebral, con consistencia semisólida, en tono amarillento con regiones -
obscuras

1+ = Area de aprox. $\frac{1}{3}$ de hemisferio cerebral, con consistencia semisólida, en tono amarillento con regiones -
obscuras

Cuadro # 2.

Alteraciones en músculoInóculo: Virus Coxsackie B₁

Observaciones histopatológicas	inóculo	días después de inóculo							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Hematopoyesis en hueso	SSB	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	VCB ₁	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Infiltración de mononucleares en ganglio	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	VCB ₁	-	-	-	-	-	-	-	-
Infiltración de mononucleares en grasa	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	VCB ₁	-	-	2+	2+	2+	3+	2+	-
Infiltración de mononucleares en músculo	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	VCB ₁	-	-	2+	2+	3+	3+	2+	-

Cuadro # 3.

Alteraciones en músculoInóculo: Flumetasona + VirusCoxsackie B₁

Observaciones histopatológicas	inóculo	horas después de inóculo							
		12	24	36	48	60	72	84	96
Hematopoyesis en hueso	SSB	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	F+VCB ₁	4+	4+	3+	3+	2+	2+	2+	2+
Infiltración de mononucleares en ganglio	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	F+VCB ₁	-	2+	2+	3+	2+	-	-	-
Infiltración de mononucleares en grasa	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	F+VCB ₁	-	2+	2+	1+	-	-	-	-
Infiltración de mononucleares en músculo	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	F+VCB ₁	1+	2+	2+	2+	-	-	-	-

Cuadro # 4.

Alteraciones en músculoInóculo: Virus Coxsackie A₃

Observaciones histopatológicas	inóculo	días después de inóculo							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Hematopoyesis en hueso	SSB	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	VCA ₃	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Infiltración de mononucleares en ganglio	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	VCA ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
Infiltración de mononucleares en grasa	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	VCA ₃	-	-	-	2+	2+	2+	1+	-
Infiltración de mononucleares en músculo	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	VCA ₃	-	1+	1+	2+	2+	2+	-	-

Cuadro # 5.

Alteraciones en músculoInóculo: Flumatasona + VirusCoxsackie A₃

Observaciones histopatológicas	inóculo	horas después de inóculo							
		12	24	36	48	60	72	84	96
Hematopoyesis en hueso	SSB	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	F+VCA ₃	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+
Infiltración de mononucleares en ganglio	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	F+VCA ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
Infiltración de mononucleares en grasa	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	F+VCA ₃	1+	2+	3+	2+	1+	-	-	-
Infiltración de mononucleares en músculo	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	F+VCA ₃	1+	2+	3+	2+	2+	-	-	-

Cuadro # 7.

Alteraciones en cerebroInóculo: Virus Coxsackie B₁

Observaciones histopatológicas	inóculo	días después de inóculo							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Gliosis	SSB	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	VCB ₁	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Cerebro reblandecido y obscuro (macroscópicamente)	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	VCB ₁	-	-	-	-	2+	3+	3+	4+
Necrosis de vasos sanguíneos con hemorragia	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	VCB ₁	-	-	-	-	1+	2+	2+	3+
Necrosis	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	VCB ₁	-	-	-	-	2+	2+	3+	3+
Pequeños focos de encefalomalacia	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	VCB ₁	-	-	-	-	1+	2+	2+	2+

Cuadro # 8.

Alteraciones en cerebroInóculo: Flumetasona + VirusCoxsackie B₁

Observaciones histopatológicas	inóculo	horas después de inóculo							
		12	24	36	48	60	72	84	96
Gliosis	SSB	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	F+VCB ₁	4+	4+	3+	2+	2+	2+	2+	2+
Cerebro reblandecido y obscuro (macroscópicamente)	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	F+VCB ₁	2+	2+	3+	3+	3+	4+	3+	4+
Necrosis de vasos sanguíneos con hemorragia	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	F+VCB ₁	-	2+	2+	3+	3+	3+	4+	4+
Necrosis	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	F+VCB ₁	-	2+	2+	2+	3+	3+	4+	4+
Pequeños focos de encefalomalacia	SSB	-	-	-	-	-	-	-	-
	F+VCB ₁	1+	1+	2+	2+	2+	3+	3+	3+

Cuadro # 12.

Alteraciones en hígadoInóculo: Virus Coxsackie B₁

Observaciones histopatológicas	inóculo	días después de inóculo							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Hematopoyesis	SSB	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	VCB ₁	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

Cuadro # 13.

Alteraciones en hígadoInóculo: Flumetasona + VirusCoxsackie B₁

Observaciones histopatológicas	inóculo	horas después de inóculo							
		12	24	36	48	60	72	84	96
Hematopoyesis	SSB	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	F+VCB ₁	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+

Cuadro # 14.

Alteraciones en hígadoInóculo: Virus Coxsackie A₃

Observaciones histopatológicas	inóculo	días después de inóculo							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Hematopoyesis	SSB	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	VCA	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

Cuadro # 15.

Alteraciones en hígadoInóculo: Flumetasona + VirusCoxsackie A₃

Observaciones histopatológicas	inóculo	horas después de inóculo							
		12	24	36	48	60	72	84	96
Hematopoyesis	SSB	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	F+VCA ₃	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+

CAPITULO V

DISCUSION

La inoculación de ratones recién nacidos constituye el método de elección para el aislamiento de virus Coxsackie a partir de muestras clínicas o de materiales biológicos que pudieran contener algunos de estos virus. Sin embargo, los períodos de incubación varían considerablemente de un tipo de virus a otro, tanto por razones inherentes a la cepa viral (cantidad de partículas infectantes en las muestras, patogenicidad y virulencia), como al sustrato biológico (tamaño al nacer, agilidad individual, susceptibilidad individual). En los ratones recién nacidos estos factores no son controlables, aún en camadas o lotes colocados en condiciones ambientales iguales, porque cada animal es un ente sui-generis genéticamente determinado. Es posible reducir la variabilidad seleccionando en forma aleatoria a los animales testigos y a los animales en prueba, que es como se realizó tal selección en este trabajo.

Por algunas de las razones ya mencionadas, con frecuencia resulta muy difícil o imposible detectar manifestaciones clínicas de mínima severidad y en otros casos la patología es tan agresiva y rápida que en el curso de unas cuantas horas el ratón pasa de un estado de aparente normalidad a la muerte, creándose incertidumbre en cuanto al posible efecto de un agente viral. También es frecuente que algunos de estos virus se multipliquen con lentitud en el animal inoculado, con períodos de incubación muy variables y hasta con una recuperación eventual de la sintomatología. En los casos de períodos de incubación largos (de 7 a 10 días) y de mediana duración (de 4 a 6 días), el acortamiento de tales períodos podría resultar útil para acelerar el aislamiento

to, la identificación del agente patógeno y el diagnóstico respectivo, de ahí que hayan sido seleccionados los tipos A₃ y B₁, en las diluciones 10⁻⁷ y 10⁻³ respectivamente, los lapsos de 12 horas para las observaciones clínicas y la eventual cosecha de los animales afectados.

Sólo de esta manera fué posible disponer de muestras apropiadas para los estudios histopatológicos.

Clínicamente, los resultados indican una reducción significativa del período de incubación cuando se administró Flumetasona 24 horas antes de la inoculación del virus. En promedio, se observaron alteraciones entre las 24 y las 48 horas, aunque en algunos casos se produjo la muerte en 24 horas y aún menos (durante la noche).

Histológicamente, según puede verse en los cuadros 1 a 15, fué posible detectar efectos de la actividad viral en forma aún más prematura, en algunos casos a las 12 horas post inoculación del virus. En los mismos cuadros puede observarse que los distintos testigos y controles no mostraron alteraciones, como era de esperarse.

En hígado y hueso se observó una disminución de células hematopoyéticas, y de gliosis en cerebro; al inocular Flumetasona y virus 24 horas después, fenómeno que no se produjo al inocular el glucocorticoide solo, de modo que podría pensarse en una acción sinérgica.

La metodología histopatológica utilizada ha permitido detectar el fenómeno inflamatorio en forma muy precoz y objetiva, --- haciendo a un lado la subjetividad y la incertidumbre de las observaciones clínicas, confiriendo un alto grado de confianza a estas pruebas de laboratorio. Presenta, sin embargo, el inconveniente de requerir personal especializado en técnicas histológi-

cas y una cantidad considerable de trabajo.

Por lo que toca a los efectos farmacológicos del glucocorticoide utilizado, ha quedado claro que inhibe el sistema inmunológico del huésped y de esa manera propicia la rápida multiplicación de los agentes patógenos inoculados. Es interesante hacer hincapié en la utilidad del proceso inflamatorio como indicador de la actividad viral aún en presencia de un fármaco con una elevada actividad antiinflamatoria.

CONCLUSIONES

1.- En las condiciones del experimento el glucocorticoide - Flumetasona, disminuye el período de incubación de los virus Coxsackie A₃ y B₁.

2.- El efecto farmacológico de la Flumetasona parece ser la inhibición del sistema inmunológico del huésped.

3.- En hígado y hueso se observó disminución de células hematopoyéticas y de gliosis en cerebro, al inocular juntos el glucocorticoide y el virus, lo que hace pensar en una marcada acción sinérgica.

4.- La metodología histopatológica utilizada permite detectar de manera más objetiva, precoz y segura, el fenómeno inflamatorio; la simple observación clínica del efecto viral puede dar lugar a errores de interpretación, y la aparición de síntomas requiere más tiempo que las alteraciones observables microscópicamente.

5.- Se recomienda realizar otros estudios similares con --- otras cepas de virus Coxsackie y tratar de definir cuál o cuales alteraciones histopatológicas pueden ser suficientes para establecer el diagnóstico de infección por estos virus, en menor --- tiempo que la observación clínica.

BIBLIOGRAFIA

- 1).- Fenner F.J., White D.O.: *Virologfa Médica*. Ed. La Prensa Médica Mexicana, México. p 278,101 (1973)
- 2).- Mirko M., Majer S.A.: *Strain of Human Viruses*. 1^a ed. Karger, New York. p 23,27 (1972)
- 3).- Rivers T.M., Horsefall: *Virus y Rickettsias*. 3^a ed. Interamericana, México. p 423 (1965)
- 4).- Jawetz E., Melvik J.L., Adelberg E.A.: *Microbiologfa - Médica*. 5^a ed. El Manual Moderno, México. p 432 (1973)
- 5).- Amonier F.J.: Structural changes in the sketal muscle of suckling mice following infection with a Cocksackie virus of the A group. Roy. Nucleo. Soc. 72, 218 (1952)
- 6).- Payling W.G.: *Introduction to Pathology*. 4th ed. Longmans, Great Britain. p 115 (1964)
- 7).- Godman G.C.: The histopathology of Cocksackie virus infection in mice. Morfologic observations with four different tissues. Ann. J. Path. 28, 233 (1952)
- 8).- Robliens S.L.: *Texbook of Pathology with Clinical Apli cations*. 2^a ed. Saunder Company, Philadelphia. p 1130 (1962)
- 9).- Kitt T.: *Tratado de Patologfa General Veterinaria*. 2^a - ed. Labor, Barcelona Madrid. p 315 (1964)

10).- Gifford R., Dalldorf: The morbid anatomy of experimental Coxsackie virus infection. *Ann. J. Path.* 27, 1047 (1951)

11).- Menkowitz S.: Hepatitis produced by Coxsackie virus - B₁ in adult mice. *Arch. Pathol.* 89, 427 (1970)

12).- Smith R.: Coxsackie virus infection in mice. *Arch. Intern. Med.* 135 (feb. 1975)

13).- Landsdown A., Coid C.R.: Pathological changes in pregnant mice infected with Coxsackie B₁ virus as a possible cause of retarded foetal development. *Pathology* 55, 101 (feb. 1974)

14).- González Morfeo C.A.: Efecto de un glucocorticoide y de un antihistamínico en el período de incubación de la rabia. - México (1975)

15).- Guyton A.C.: Tratado de Fisiología Médica. 4^a ed. Interamericana, México. p 945 (1971)

16).- Litter M.: Farmacología Experimental y Clínica. 4^a ed. Ateneo, Buenos Aires. p 1139, 1140, 1144 (1973)

17).- Comisión Técnico Consultiva: Fármacos. 1^a ed. Cámara Nacional de la Industria Químico Farmacéutica, México. p 285 --- (1973)

18).- Slitz M.: Flumetasona. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 2318 --- (1960)

- 19).- Menkin: The significance of the accumulation of corti-
sona in an inflamed area. *Bait. Jour. Exper. Path.* 34, 412 ----
(1953)
- 20).- Meyer, Jones L.M.: *Farmacología y Terapéutica Veteri-
naria*. 2^a ed. UTHEA, México. p 663 (1959)
- 21).- Hirsch J.C.: *The inflammatory Process*. 2^a ed. Academic
Press, New York y London. p 269 (1965)
- 22).- Wilson G.: *Texbook of Organic Medicinal and Pharmaco-
logical Chemistry*. 6th ed. J.B. Lippencott Company, Philadelphia
Toronto. p 806 (1971)
- 23) - Pérez Duarte R.: Estudio sobre el proceso inflamato-
rio en una vaca y la acción de la betametasona. *Revista de la Fa-
cultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 3, 44 (1972)
- 24).- Sharp S.: Mechanism of action of aldosterone. *Physiol.*
Rev. 46, 593 (1966)
- 25).- Beckman R.: *Drugs, Their Nature, Action and Use*. 4th
ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London. p 584 (1968)
- 26).- Habat E.A.: *Structural Concepts in Immunology and Im-
munochemistry*. 2th ed. Halt Rumbart Winston, London. p 367 (1976)
- 27).- Schwarts R.W.: *Inmunosupresive drugs*. *Progrs. Aller.*
2, 246 (1965)

28).- Boyd W.C.: Fundamentals of Immunology 3th ed. Interscience Publishers, London. p 30 (1960)

29).- Model W.: Drugs of Choice. Ed. C.U. Mostery Company, St Louis. P 268 (1975)

30).- Histopathology Laboratories, Armed Forces Institute of Pathology Washington D.C. 20305. p 16, 35 (1976)