

Tesis de Posgrado

Infección experimental del *Calomys masculinus* con virus Junín : Modelo de infección crónica

Lampuri, Jorge Salvador

1984

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lampuri, Jorge Salvador. (1984). Infección experimental del *Calomys masculinus* con virus Junín : Modelo de infección crónica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1847_Lampuri.pdf

Cita tipo Chicago:

Lampuri, Jorge Salvador. "Infección experimental del *Calomys masculinus* con virus Junín : Modelo de infección crónica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1847_Lampuri.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"INFECCION EXPERIMENTAL DEL Calomys musculinus CON VIRUS JUNIN:

MODELO DE INFECCION CRONICA"

Jorge Salvador Lampuri

Tesis para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1984 -

1847
52

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"INFECCION EXPERIMENTAL DEL Calomys musculus CON VIRUS JUNIN:

MODELO DE INFECCION CRONICA"

AUTOR: Lic. Jorge Salvador Lampuri

DIRECTOR: Dra. Celia E. Coto

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Virología. Departamento de Química Biológica.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A.

Tesis presentada para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

A MI ESPOSA,
A MI HIJA,
A MIS PADRES.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Celia E. Coto por su dirección, apoyo y estímulo que permitió la realización de este trabajo, y fundamentalmente por el afecto brindado.

A la Lic. María del Carmen Vidal, compañera y colaboradora durante la realización de este trabajo.

A los Dres. Rubén P. Laguens y R. Martín Laguens por su colaboración en la ejecución e interpretación de los estudios anatomopatológicos e inmunohistoquímicos.

A los Lic. Nélide Candurra, Laura Alché y Félix Coulombie por su especial colaboración en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Elsa Damonte, Guillermina Help, Susana Mersich, Cristina D'Aiutolo, Noemí Steyerthal, Mónica Wachsman, Graciela Andrei, Marcelo Daeli, por su estímulo constante.

A la Sra. Sofía Piccinalli, por su ayuda inestimable en el funcionamiento del laboratorio.

Al Sr. Hector A. De Riso, Representante Legal del laboratorio Sclavo, por hacer posible la edición de esta tesis.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. INFECCIONES VIRALES PERSISTENTES.....	1
1.2. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LOS DISTINTOS MECANISMOS DE PERSISTENCIA VIRAL.....	11
1.3. ASPECTOS BIOLOGICOS DE LOS ARENAVIRUS.....	19
1.3.1. VIRUS MACHUPO Y LATINO.....	22
1.3.2. VIRUS LASSA.....	25
1.3.3. VIRUS TAMIAMI.....	26
1.3.4. VIRUS PARANA.....	29
1.3.5. VIRUS PICHINDE.....	30
1.3.6. VIRUS TACARIBE.....	31
1.3.7. VIRUS AMAPARI.....	31
1.3.8. VIRUS DE LA CORIOMENINGITIS LINFOCITARIA.....	32
1.3.9. VIRUS JUNIN.....	42
2. OBJETIVOS.....	50
3. MATERIALES Y METODOS.....	51
3.1. VIRUS.....	51
3.1.1. VIRUS JUNIN.....	51
3.1.2. VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR.....	51
3.2. ANIMALES.....	51
3.2.1. <u>Calomys musculinus</u>	51

3.2.2. RATONES.....	53
3.3. CULTIVO DE TEJIDOS.....	53
3.3.1. CELULAS VERO.....	53
3.3.2. CELULAS L-929.....	53
3.4. PREPARACION DE STOCKS DE VIRUS JUNIN.....	54
3.5. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE Y SUERO.....	55
3.6. ESTUDIOS SEROLOGICOS: PRUEBA DE NEUTRALIZACION.....	55
3.7. AISLAMIENTO Y TITULACION DE VIRUS.....	56
3.8. ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS E INMUNOHISTOQUIMICOS.....	58
3.9. ESQUEMAS EXPERIMENTALES.....	59
3.10. CARACTERIZACION DE LAS POBLACIONES VIRALES PRESENTES EN <u>C. musculus</u> INFECTADOS CON VIRUS JUNIN.....	59
3.10.1. DETERMINACION DE VARIANTES TERMOSENSIBLES.....	59
3.10.2. DETERMINACION DE VARIANTES SEROLOGICAS.....	60
3.11. OBTENCION DE CLONES VIRALES.....	60
3.12. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	61
3.13. ENSAYOS DE INTERFERENCIA VIRAL.....	62
3.14. TRATAMIENTO PROTEOLITICO DE SUSPENSIONES DE CEREBRO.....	63
3.15. TRATAMIENTO LIPOLITICO DE SUSPENSIONES DE CEREBRO.....	63
3.16. OBTENCION DE MACROFAGOS PERITONEALES DE <u>C. musculus</u>	64
3.17. PURIFICACION DE INTERFERON.....	65
3.18. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE INTERFERON.....	65

4. RESULTADOS.....	66
4.1. CARACTERIZACION DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DEL <i>Calomys</i>	
<i>musculus</i> NEONATO.....	66
4.1.1. SUSCEPTIBILIDAD DEL <u><i>C.musculus</i></u> A LA INFECCION CON VIRUS	
JUNIN. INFLUENCIA DE LA DOSIS Y VIA DE INOCULACION.....	66
4.1.2. SUSCEPTIBILIDAD DEL <u><i>C. musculus</i></u> DE DISTINTAS EDADES A LA	
INFECCION CON VIRUS JUNIN POR VIA INTRAPERITONEAL.....	69
4.1.3. DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD.....	70
4.1.4. PATOGENESIS DE LA INFECCION.....	75
4.1.4.1. INFECCION AGUDA.....	76
4.1.4.1.1. AISLAMIENTOS VIRALES.....	76
4.1.4.1.2. ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS.....	78
4.1.4.1.3. DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOFLUORESCENCIA.....	80
4.1.4.1.4. SEROLOGIA...-.....	82
4.1.4.2. ROL DE LOS MACROFAGOS PERITONEALES EN LA INFECCION	
EXPERIMENTAL DEL <u><i>Calomys musculus</i></u> POR VIA i.p. CON	
VIRUS JUNIN.....	83
4.1.5. INFECCION PERSISTENTE.....	89
4.1.5.1. AISLAMIENTOS VIRALES.....	90
4.1.5.2. ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS.....	94
4.1.5.3. DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOFLUORESCENCIA.....	96
4.1.5.4. ESTUDIOS SEROLOGICOS.....	97
4.1.6. CONCLUSIONES PARCIALES.....	97

4.2. CARACTERISTICAS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DEL <u>C. mus-</u> <u>culinus</u> ADULTO.....	103
4.2.1. SUSCEPTIBILIDAD DEL <u>C.musculus</u> ADULTO A LA INFECCION POR VIA INTRAPERITONEAL E INTRANASAL.....	103
4.2.2. SUSCEPTIBILIDAD DEL <u>C.musculus</u> ADULTO A LA INFECCION CON VIRUS JUNIN POR VIA i.n.: INFLUENCIA DE LA DOSIS INOCULADA.....	105
4.2.3. DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD.....	108
4.2.4. PATOGENESIS DE LA INFECCION.....	109
4.2.4.1. ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS.....	109
4.2.4.2. DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOFLUORESCENCIA.....	110
4.2.4.3. AISLAMIENTOS DE VIRUS.....	110
4.2.4.4. SEROLOGIA.....	111
4.2.5. CONCLUSIONES PARCIALES.....	111
4.3. POSIBLES MECANISMOS DE TRANSMISION DEL VIRUS JUNIN.....	115
4.3.1. INFECCION DE C. musculus ADULTO POR CONTACTO CON CRIAS INFECTADAS.....	116
4.3.2. TRANSMISION VERTICAL DEL VIRUS JUNIN EN <u>C. musculus</u> PERSISTENTEMENTE INFECTADOS.....	118
4.3.3. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE LAS SECCIONES 4.3.1 Y 4.3.2.....	119
4.3.3.1. REGISTRO DE MORBIMORTALIDAD.....	119

4.3.3.2. ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS.....	120
4.3.3.3. DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOFLUORESCENCIA.....	120
4.3.3.4. AISLAMIENTO DE VIRUS.....	122
4.3.3.5. SEROLOGIA.....	122
4.3.4. CONCLUSIONES PARCIALES.....	122
4.4. FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL ESTABLECIMIENTO Y/O MANTENIMIENTO DE LA INFECCION PERSISTENTE DEL <u>Calomys</u> <u>musculus</u> CON VIRUS JUNIN.....	126
4.4.1. FENOMENO DE INTERFERENCIA EN LAS POBLACIONES VIRALES AISLADAS DE CEREBROS DE <u>C.musculus</u> CRONICAMENTE INFECTADOS.....	129
4.4.2. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD INTERFERENTE PARA VIRUS JUNIN PRESENTE EN EL CEREBRO DEL <u>Calomys musculus</u>	140
4.4.2.1. DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD ANTIVIRAL.....	145
4.4.2.2. MECANISMO DE ACCION.....	145
4.4.2.3. SENSIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD INTERFERENTE A ENZIMAS PROTEOLITICAS Y SOLVENTES LIPIDICOS.....	149
4.4.3. CONCLUSIONES PARCIALES.....	152
4.4.4. DETECCION DE VARIANTES TERMOSENSIBLES PRESENTES EN LAS POBLACIONES VIRALES AISLADAS DE CEREBROS DE <u>Calomys musculus</u> PERSISTENTEMENTE INFECTADOS CON VIRUS JUNIN.....	153
4.4.5. DETECCION DE VARIANTES SEROLOGICAS EN LA INFECCION CRONICA DEL <u>Calomys musculus</u> CON VIRUS JUNIN.....	160

4.4.6. PARTICIPACION DEL INTERFERON EN LA INFECCION PERSISTENTE

DEL <u>Calomys musculinus</u> CON VIRUS JUNIN.....	163
5. DISCUSION.....	166
6. CONCLUSIONES.....	182
7. RESUMEN.....	186
8. BIBLIOGRAFIA.....	187

1. INTRODUCCION

1.1. INFECCIONES VIRALES PERSISTENTES

Las infecciones virales se clasifican según su evolución en AGUDAS o PERSISTENTES.

Las infecciones agudas polarizaron la atención de los estudios virológicos durante muchos años. Las características de su evolución son: períodos de incubación cortos, seguidos por sintomatología acompañada generalmente por fiebre y posteriormente recuperación con eliminación del virus del organismo. Estas infecciones se autolimitan y difícilmente presentan complicaciones tardías; el aislamiento de virus infeccioso en sangre o secreciones del paciente solamente es exitoso en un corto intervalo desde poco antes hasta poco después de la aparición de los síntomas.

La lucha contra este tipo de infecciones virales se ha encarado desde el punto de vista profiláctico, debido a la falta de antivirales adecuados, y gracias al desarrollo de numerosas vacunas, muchas de estas enfermedades han sido o están en camino de ser erradicadas.

Como consecuencia de los avances logrados en este campo, gran parte de los recursos en Virología se han volcado últimamente al estudio de las enfermedades del tipo persistente, en las que el virus está presente en el organismo, con o sin manifestaciones clínicas, durante meses y aún años.

A diferencia con las enfermedades del primer grupo, la primo-infección generalmente es asintomática o leve. Además estas infecciones pueden resultar reservorios para que virus infeccioso se disemine a nuevos huéspedes susceptibles.

Las infecciones persistentes se pueden clasificar en tres categorías:

1) INFECCIONES LATENTES

Se denominan así a las infecciones que cursan con episodios reiterados de enfermedad aguda, con períodos asintomáticos durante los cuales el virus es difícil de aislar.

El ejemplo clásico es el virus Herpes Simple, el cual durante la infección primaria replica en las células nerviosas de algunos ganglios, en donde se acantona y persiste durante los períodos asintomáticos. Cuando se producen los episodios agudos, causados por reactivación viral, debido a "stress", radiaciones solares, menstruación, etc, el virus migra utilizando los nervios sensores a la piel, donde multiplica formando vesículas.

2) INFECCIONES CRONICAS

Se caracterizan porque el virus se puede demostrar en cualquier momento luego de la primo-infección, pero sin evidencias de síntomas de enfermedad, o asociados con inmunopatologías tardías o neoplasias.

Para ejemplificar la primer situación, o sea las infecciones persistentes con prescindencia de sintomatología, podemos tomar al Citomegalovirus, que se aísla en muchas personas a partir de saliva, orina, biopsias de riñón o leucocitos circulantes, sin enfermedad aparente, salvo

cuando es activado en pacientes inmunosuprimidos o transmitido por transfusiones sanguíneas.

Quando las manifestaciones virales están asociadas a inmunopatías tardías, estas generalmente son debidas a que coexisten en el organismo virus y anticuerpos circulantes, que dan lugar a la formación de complejos inmunes. Estas entidades pueden ser fagocitadas y eliminadas por células especializadas, o se pueden depositar en los tejidos del organismo y producir enfermedades por inmunocomplejos. El órgano más comprometido en estas inmunopatías es el riñón, debido a su función filtrante; provocándose glomerulonefritis, que han sido descritas para distintos virus: Deshidrogenasa Láctica (LDH), Anemia Infecciosa Equina, Coriome-ningitis Linfocitaria (LCM) y Enfermedad del visón aleutiano (ALV).

3) INFECCIONES LENTAS

Están caracterizadas por un largo período de incubación asintomático (meses o años) sin eliminación de virus por el huésped; la enfermedad también es prolongada con un desarrollo lento y progresivo que en la mayoría de los casos es mortal.

Las enfermedades causadas por los denominados virus lentos son producto directo de la multiplicación viral o de una respuesta inmune a la infección.

Los agentes etiológicos de las virosis lentas, pueden ser clasificados en dos grupos, según el tipo de patología que producen: Un primer grupo formado por Kuru, Síndrome de Creutzfeldt-Jakob del hombre, Scrapie de ovinos y caprinos y la Encefalopatía Transmisible del visón.

Estos agentes causan las encefalopatías subagudas espongiiformes, en las que no se detectan reacciones inflamatorias ni respuesta humoral o celular a la infección, y son denominados actualmente "priones" o virus no convencionales, por su resistencia a la inactivación química o física y aparente falta de ácido nucleico.

El otro grupo integrado por el virus del Sarampión productor de la Panencefalitis subaguda esclerosante (SSPE), el virus Rubeola asociado con la Panencefalitis rubeólica, la Leucoencefalopatía multifocal progresiva causada por el virus del mismo nombre del grupo Papovavirus, así como el virus Visna de las ovejas, que a diferencia con los agentes del primer grupo producen infecciones con respuesta inflamatoria y reacción inmunológica del huésped.

Se debe notar que estas clasificaciones no son estrictas, así como no lo es el comportamiento de los virus, debido a la influencia o modificaciones ejercidas por los distintos huéspedes. Por esta razón un mismo virus puede presentarnos distintos tipos de infecciones persistentes o infectar persistentemente algunos huéspedes y en forma aguda a otros.

De estos comportamientos duales surge el interrogante que da origen a este trabajo de tesis, ¿Cuáles son las causas de que un virus modifique su fase de producción viral citotóxica a la fase persistente no citotóxica?.

Las condiciones generales que se deben cumplir para que un virus pueda existir por períodos prolongados en un organismo son las siguientes:

a) Los mecanismos inmunológicos del huésped deben estar impedidos de cumplir sus funciones, que llevarían finalmente a la eliminación del agente infeccioso.

b) La replicación viral debe estar regulada, a fin de evitar un aumento inconveniente de su concentración en el organismo, pero asimismo permitir el recambio natural de la población viral.

c) Los tejidos vitales no deben ser dañados en un grado tal que sus funciones estén impedidas.

Estas condiciones generales resumen muy sucintamente el amplio espectro de mecanismos alternativos gracias a los que se establecen y mantienen las infecciones persistentes. Con el objeto de determinar los mecanismos más comunes utilizados en los distintos sistemas virus-huésped se reseñarán en el siguiente cuadro las infecciones persistentes más importantes y sus características.

VIRUS	HUESPED	INFECCION PERSISTENTE	LOCALIZACION DE LA INFECCION	ENFERMEDAD	ANTI- CUERPOS	ELIMINACION DE VIRUS
HERPES SIMPLE	hombre	latente	Entre episodios agudos oculto en cél. nerviosas del ganglio trigé- mino y médula dorsal.	Primaria: estomatitis Recurrente: Cé. de Schwann, ampollas epiteliales.	si	esporádicamente en saliva (en- tre ataques). Altos títulos en ampo- llas recurrentes.
VARICELA - ZOSTER	hombre	latente	idem Herpes Simple. eritema. Recurrente: Cé. de Schwann, luego células epitelia <u>l</u> a les.	Primaria: Infeccción generalizada, Varicela. Recurrente: erupción en piel, Zoster.	si	Varicela: de gar- ganta y lesiones de piel. Zoster: de lesio- nes de piel.

VIRUS	HUESPED	INFECCION PERSISTENTE	LOCALIZACION DE LA INFECCION	ENFERMEDAD	ANTI- CUERPOS	ELIMINACION DE VIRUS
Varios:	mono	crónica	riñón	No reconocida. Se aisla virus en explantos de células.	si	variable según el virus involucrado.
SV40-REO-ADENO- HERPES-PARAMIXO.						
CITOMEGALO	muchas especies	crónica	glándulas salivales	No reconocida	si	saliva
CITOMEGALO	hombre	crónica	glándulas salivales riñón leucocitos circulan tes.	Raramente. Activado por inmunosupresión o transido por transfusiones de sangre, produce mononucleosis .	si	orina saliva
EPSTEIN-BAR	hombre	crónica	téjido linfóideo leucocitos circulan tes.	Usualmente no existe. Se lo ha asociado con linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo. Mononucleosis infecciosa post-transfusional.	si	no

VIRUS	HUESPED	INFECCION PERSISTENTE	LOCALIZACION DE LA INFECCION	ENFERMEDAD	ANTI- CUERPOS	ELIMINACION DE VIRUS
HEPATITIS B	hombre	crónica	hígado suero	Raramente hepatitis cró- nicas, transmitido por transfusiones.	si	heces (bajos títulos)
RUBEOLA	hombre	crónica	diseminada	Síndrome Rubeola, con muerte o recuperación, con presencia de defec- tos teratológicos.	si	orina saliva
CORIONINGITIS LINFOCITARIA	ratón	crónica	diseminada, inclu- yendo tejido lin- fóideo.	Glomerulonefritis	si	orina viremia persis- tente(complejos inmunes infeccio- sos).
DESHIDROGENASA LACTICA	ratón	crónica	macrófagos	Inmunocomplejos en glomeru- los, pero no existe enferme- dad.	si	viremia persis- tente(complejos inmunes infecciosos)

VIRUS	HUESPED	INFECCION PERSISTENTE	LOCALIZACION DE LA INFECCION	ENFERMEDAD	ANTI-CUERPOS	ELIMINACION DE VIRUS
ENFERMEDAD DEL VISON ALEUTIANO	visón	crónica	macrófagos en hígado y bazo	Poliarteritis, glomerulonefritis, plasmocitosis sistémica causante de hiperglobulinemia.	si	viremia persistente(complejos inmunes infecciosos).Orina, saliva y heces.
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA	caballo	crónica	macrófagos de sangre y tejidos (bazo, hígado y nódulos linfáticos).	Anemia, vasculitis, glomerulonefritis, fiebre recurrente. Episodios recurrentes.	si	Complejos inmunes infecciosos.Transmisión mecánica por artrópodos.
LEUCEMIA MURINA	ratón	crónica	diseminada	Immunocomplejos en glomerulo, ocasionalmente leucemia.	si	no
LEUCOSIS AVIARIA	pollo	crónica	diseminada	ocasionalmente leucemia raramente sarcoma	si	no

VIRUS	HUESPED	INFECCION PERSISTENTE	LOCALIZACION DE LA INFECCION	ENFERMEDAD	ANTI-CUERPOS	ELIMINACION DE VIRUS
VISNA	oveja	lenta	cerebro	progresiva y lenta	si	no
MAEDI	"	"	pulmón	viremia recurrente	"	
NEUMONIA PROGRE	"	"	pulmón	componentes inmunopatológicos	"	
SIVA.						
SCRAPIE	oveja	lenta	sistema nervioso	Encefalopatías progresivas lentas.	no	no
ENCEFALOPATIA - del VISON	visón	"	central y tejido dos linfóideo		"	
KURU	hombre	"			"	
CREUTZFELDT - JAKOB	hombre	"			"	
SARAMPION(SSPE)	hombre	"	SNC	Aguda:sarampión.Recuperación y años más tarde <u>encefalitis</u> progresiva lenta.	si	

1.2. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LOS DISTINTOS MECANISMOS DE PERSISTENCIA VIRAL

La clasificación de infecciones persistentes, agrupa un amplio espectro de afecciones. En este punto se tratará de reseñar las coincidencias que existen entre los distintos mecanismos por los cuales los virus pueden establecerse en un huésped superando las defensas del mismo.

Son muchos los factores que sinérgicamente concurren en los distintos mecanismos por los que se establece y mantiene una infección persistente, y sólo se puede especular cual de ellos tiene un rol preponderante en ciertas infecciones.

DEFICIENCIAS EN LA INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR

TOLERANCIA

Muchas infecciones persistentes están asociadas con una muy pequeña respuesta de anticuerpos, especialmente cuando la infección ocurre en forma intrauterina o neonatal. En estos estadíos, la inmunocompetencia es baja o se está desarrollando, de forma tal que los mecanismos inmunológicos no favorecerán las manifestaciones clínicas de infecciones virales productoras de inmunopatías.

La tolerancia inmunológica generalmente es incompleta, dado que se ha demostrado en ratones infectados congénitamente con virus LCM, LDH o Leucemia murina, que soportan la multiplicación viral, sin enfermedad evidente, pero presentan distintos grados de hiporeactividad específica.

La pequeña cantidad de anticuerpos producidos, se detecta sola-

mente como inmunocomplejos circulantes, que luego se depositan en los glomérulos u otros tejidos.(24,32,56)

Es posible que la presencia de antígenos virales durante el desarrollo temprano, particularmente en tejido linfóideo, induzca tolerancia como han propuesto Burnet y Fenner para LCM. (5). Esto sería posible, debido a la destrucción específica de células que reaccionan con determinados antígenos. (67)

En los casos en que hay producción de complejos inmunes circulantes, estos pueden ser infecciosos (24,54,68), e infectar a otras células o ser fagocitados por macrófagos donde el virus es capaz de replicar y aún persistir. En consecuencia, la eliminación del virus por medio del macrófago no se produce y por el contrario, se favorece la persistencia viral. (47)

Son varias las enfermedades crónicas en las que el virus parece multiplicar fundamentalmente en macrófagos, tal es el caso de ALV, AEI, y LDH. La infección de estas células puede modificar la presentación del antígeno por parte del macrófago a los linfocitos T, así como otras funciones del sistema retículo endotelial, como sucede en la infección del ratón con el virus LDH, donde los niveles de enzimas plasmáticas están muy elevadas por falta de eliminación.(82)

INMUNODEPRESION

En las infecciones persistentes, a menudo los virus causan inmunosupresión.(55) Este fenómeno se manifiesta como una respuesta deprimida de la inmunidad humoral hacia antígenos no relacionados, como se ha demostrado en Leucosis murina (55), Tumor mamario (47), LCM (49),

Enfermedad del visón aleutiano (68), Citomegalo virus (33) y otros.

La duración del estado de inmunosupresión es generalmente corto, siendo máximo en el momento de la inducción de la respuesta inmune para el virus infectante. (33,49)

También se ha observado clínicamente, depresión de la inmunidad celular en humanos vacunados con virus vivo o luego de una infección natural (47). Estas observaciones fueron confirmadas posteriormente por experimentos realizados con ratones infectados con virus de Newcastle (NDV) o de la Leucemia de Gross, los que mostraron mayor sobrevida al ser transplantados con tejidos alogeneicos, comparativamente con los controles no infectados con virus. (98)

La inmunosupresión estaría mediada por los siguientes mecanismos:

a) Cambios funcionales o destrucción de células mieloides o linfocitos y/o sus precursores, mediado por virus.

b) Competencia antigénica.

c) Inmunodepresión como resultado de un incremento de secreción adrenocortical.

d) Inmunodepresión mediada parcialmente por interferón. (81)

PRODUCCION DE ANTICUERPOS BLOQUEANTES O NO NEUTRALIZANTES

En numerosas infecciones persistentes se detecta la formación de anticuerpos no neutralizantes. Como ejemplos podemos citar las infecciones mediadas por los virus LCM (30), LDH (45), ALV (68) y Leucosis marina (55).

Estos anticuerpos reaccionan específicamente con los antígenos virales que les dieron origen, pero carecen de poder neutralizante, por lo que se forman complejos antígeno-anticuerpo infecciosos circulantes, que se pueden detectar precipitándolos con antiglobulinas.

Experimentos en cultivo de tejidos demostraron que se puede reducir el efecto citotóxico entre células infectadas con virus y linfocitos T, por el agregado de anticuerpos específicos. (79)

Aún así los conocimientos acerca de los anticuerpos no neutralizantes en las infecciones in vivo son pobres, habiéndose determinado solamente que están dirigidos a sitios no críticos sobre la superficie viral, que pueden bloquear la actividad de los anticuerpos neutralizantes así como la inmunidad mediada por células, favoreciendo la persistencia viral. (47)

MODULACION DE LA EXPRESION ANTIGENICA SOBRE LA SUPERFICIE DE LA CELULA INFECTADA

Cuando la densidad de antígeno viral sobre la superficie de la célula infectada es menor que la necesaria para la formación del número crítico de dobletes de inmunoglobulinas, no tiene lugar la fijación de complemento y en consecuencia no hay lisis celular, favoreciendo así la persistencia viral.

La modulación antigénica puede ocurrir en infecciones en las que el genoma viral está integrado al del huésped, y solamente expresa algunos pocos antígenos, como es el caso de las infecciones con Leucemia murina, en las que sólo se forma el antígeno gs que induce bajos niveles

de anticuerpos, que además no fijan complemento. (47)

En cultivos infectados persistentemente con virus Sarampión, cuyos medios de cultivo habían sido suplementados con anticuerpos específicos, se observó coronamiento ("capping") y desnudamiento ("stripping") de antígenos virales sobre la membrana celular. (39). La remoción de antígenos virales de la superficie celular ocurrió rápidamente y estuvo asociada con una reducida lisis celular mediada por anticuerpos fijadores de complemento, aún así, se continuó sintetizando y expresando antígeno viral, que pudo ser detectado en el citoplasma. (39)

En relación con el elevado título de anticuerpos antisarampión presentado por pacientes con SSPE, se sugirió que la modulación antigénica jugaría un rol preponderante en la patogenia de SSPE y de otras infecciones persistentes con respuesta de altos títulos de anticuerpos. (58)

PRODUCCION BAJA O NULA DE INTERFERON

Por lo general los virus que causan infecciones persistentes, no son buenos inductores de interferón en sus hospedadores naturales.

En ratones infectados persistentemente con LCM, no se ha podido dosar ningún tipo de interferón, aunque estos mismos ratones responden con producción de interferón ante la infección por otros virus, por lo que la incapacidad de inducción de interferón estaría ligada al virus persistente. (47,81)

DESARROLLO DE VARIANTES DE BAJA CITOPATOGENICIDAD, TERMOSENSIBLES Y DEFECTIVAS INTERFERENTES

Gran parte de los conocimientos relativos a las infecciones persistentes derivan de las experiencias realizadas con cultivos celulares. Los estudios de caracterización de las poblaciones virales presentes en estos cultivos, han detectado la presencia de variantes que se diferencian del virus parental en:

- a) citopatogenicidad
- b) termosensibilidad
- c) termolabilidad

Los virus que causan infecciones persistentes generalmente no tienen un efecto citopatogénico muy severo y causan cambios mínimos en el metabolismo celular. Esto es válido para la mayoría de los virus que salen de la célula por brotación, aunque, los virus citolíticos pueden causar también infecciones persistentes cuando la destrucción celular está restringida a un número pequeño de células, cuya pérdida no afecta la funcionalidad de los tejidos y órganos.

En consecuencia, el desarrollo de mutantes de baja citopatogenicidad presenta ventajas claras para el mantenimiento de un estado persistente.

Entre las causas que regulan la replicación viral y así determinan el curso de la infección viral, se encuentran las mutantes termosensibles (ts). La asociación entre persistencia y ts, se debió fundamentalmente a los hallazgos de J.S. Younger trabajando en cultivos "carrier" de células L infectadas con virus de Newcastle, de V. Stollar con el sistema de células Aedes albopictus infectadas con virus Sindbis y de E. Damonte con el sistema células Vero - virus Junín, quienes encontra-

ron coincidentemente la presencia de mutantes ts en las poblaciones virales obtenidas de cultivos persistentemente infectados. (13,47,100)

También se han aislado este tipo de mutantes virales, de animales crónicamente infectados con virus Aftoso, Estomatitis vesicular (VSV) y Parainfluenza.

La relación entre infección persistente y mutantes ts, quedó definitivamente demostrado cuando se infectaron ratas recién nacidas con Réovirus tipo 3 cepa salvaje o mutante ts. Se encontró que los animales infectados con virus salvaje, morían a causa de una encefalitis aguda alrededor del día 12 post-infección (p.i.), mientras que la mutante ts causó solamente encefalitis fatales cuando fue inoculada en altas dosis. Por el contrario, cuando se inocularon bajas concentraciones, la mayoría de los animales sobrevivieron a la infección y se presentaban clínicamente sanos; aunque el análisis histológico realizado meses después en estos animales, demostró que existía degeneramiento de la corteza cerebral. (81)

En coincidencia con estos resultados, se detectaron modificaciones en la neurovirulencia del virus Sarampión cuando se inocularon ratones con mutantes ts en lugar de la cepa salvaje. (81)

Además de las mutantes ts, las partículas interferentes, tendrían un rol en el establecimiento y mantenimiento de las infecciones persistentes, aunque hasta el presente la participación de las partículas interferentes solamente se ha demostrado inequívocamente en cultivo de tejidos, dado que los datos de infecciones in-vivo no le otorgan un rol definitivo en este sentido.

Entre los posibles mecanismos de acción utilizados por las partículas interferentes (PI), se encuentra la limitación de la replicación del virus infeccioso. Este mecanismo permitiría llegar con el transcurso del tiempo a un equilibrio entre la formación de virus infeccioso y PI, lo cual posibilitaría una replicación viral continua pero con una producción de virus infeccioso relativamente baja, con pequeño o ningún daño aparente para el organismo. Dicha interacción sería importante tanto en la iniciación como en el mantenimiento de las infecciones persistentes. (62)

Otro mecanismo propuesto para las PI, es la inducción de interferón, como se ha demostrado para VSV. (47)

De la breve reseña de los distintos tipos de infecciones persistentes y de los factores que intervienen en el establecimiento y/o mantenimiento de las mismas, se puede concluir que: las infecciones persistentes están mediadas por uno o más mecanismos que involucran a distintos factores, y que el conjunto establecerá el tipo de infección a cursar por el huésped.

1.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LOS ARENAVIRUS

En 1970 la clasificación taxonómica viral fue modificada con el agregado de una nueva familia, ARENAVIRIDAE. Este grupo taxonómico integrado por 11 virus, fue propuesto sobre las siguientes bases:

1. Similitudes morfológicas: viriones de aspecto pleomórfico, con envoltura y presencia de partículas en su interior, que observadas al microscopio electrónico se presentan como gránulos de arena, lo cual da el nombre a la familia. Dichos gránulos, de 20 a 25 nm de diámetro, son ribosomas de origen celular.

2. Poseen como material genético, ácido ribonucleico (ARN) cadena simple fragmentado.

3. Relaciones antigénicas a través de un antígeno específico de grupo, demostrable por inmunofluorescencia. Además una parte de los virus clasificados en esta familia comparten un antígeno fijador de complemento, lo cual ha permitido agruparlos de la siguiente forma:

a) Virus del viejo mundo: que comprende al virus LCM (diseminado universalmente) y a los virus Lassa y Mozambique (ambos de Africa occidental)

b) Virus del nuevo mundo o Complejo Tacaribe: (integrado por aquellos miembros que comparten el antígeno fijador de complemento) Junín, Tamiami, Tacaribe, Pichinde, Machupo, Paraná, Amaparí y Latino. Estos virus han sido aislados de distintos lugares del continente Americano como se puede ver en la figura 1.

FIGURA 1

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS MIEMBROS DEL COMPLEJO TACARIBE PERTENECIENTES

A LA FAMILIA ARENAVIRIDAE



Una característica de los arenavirus, es que la mayoría de sus miembros están estrechamente asociados a roedores, que sirven como reservorios naturales.

Se asume generalmente que las infecciones crónicas causadas por los arenavirus en sus huéspedes naturales, son asintomáticas, con mínimo o ningún daño tisular y con transmisión vertical u horizontal, como mecanismo fundamental por el que se perpetúan en la naturaleza.

Esta generalización de la relación virus-huésped se debe fundamentalmente a la gran cantidad de estudios realizados sobre la infección natural o experimental del ratón con LCM; mientras que los conocimientos acerca de las interacciones de los demás miembros de la familia con sus reservorios naturales, son escasos o nulos.

Algunas de las falencias en el tema, se deben a que gran parte de los virus de esta familia no representan riesgo biológico para el hombre, dado que no han sido asociados con ningún síndrome en particular, y en consecuencia los recursos para investigar en esta área son destinados a otros agentes. En relación con los tres miembros del grupo que causan patologías humanas, (Lassa, Machupo y Junín), los avances obtenidos son un poco mayores, aunque no suficientes, y creo que se debe fundamentalmente a que dichos virus tienen distribuciones geográficas limitadas, y los países involucrados no cuentan con los recursos e infraestructura adecuadas para afrontar los riesgos de trabajo que presentan las investigaciones de estos agentes, quedando fundamentalmente en manos de organismos internacionales los avances en el tema.

Afortunadamente la Fiebre Hemorrágica-Boliviana, cuyo agente causal es el virus Machupo, se ha ido extinguiendo en forma natural y hace ya varios años que no se registran casos humanos.

Con la intención de relacionar y comparar los datos de las infecciones crónicas causadas por los arenavirus en sus huéspedes naturales y los obtenidos en este trabajo, se reseñarán los principales conocimientos de cada uno de los diferentes sistemas virus-huésped.

1.3.1. VIRUS MACHUPO Y LATINO

El virus Machupo, agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Boliviana, fue aislado en 1965. El virus Latino, al que no se lo asocia a ninguna patología humana, fue aislado en 1970. Ambos virus serán tratados en conjunto debido a que comparten su huésped natural, el cricétido Calomys callosus, cuyo hábitat se encuentra en las sierras bolivianas.

El virus Latino produce en el Calomys callosus una infección crónica no tolerante, sin viremia. Por el contrario el virus Machupo induce una infección inmunotolerante con viremia persistente, en animales recién nacidos. Cuando la infección se realiza en animales mayores de 9 días de edad, se obtiene una infección con respuesta dividida. Aproximadamente la mitad de los animales infectados, presentan una respuesta inmunotolerante, caracterizada por una marcada anemia hemolítica, esplenomegalia, viremia, viruria, y poca o ninguna producción de anticuerpos neutralizantes o inmunofluorescentes. El resto de los cricétidos desarrollan una respuesta inmunocompetente, con producción de anticuerpos

neutralizantes, fijadores de complemento e inmunofluorescentes, capaces de clarificar la viremia; asimismo no se observó esplenomegalia, ni anemia, y la viruria fue mínima o nula.(93,94)

Los porcentajes obtenidos para una y otra respuesta a la infección, se vieron modificados al variar las dosis inoculadas.Obteniendo se un considerable incremento en el número de animales con respuesta tolerante cuando la dosis de virus inoculada decreció de 10^6 a 10^2 UFP/animal. El mismo fenómeno se observó al inocular roedores con fenotipo cosanguíneo, sugiriendo la importancia de los factores genéticos en la selección de una y otra respuesta.

El desarrollo de las infecciones con respuesta tolerante, está acompañado de efectos a largo plazo, entre los que se encuentran: menor desarrollo de los animales infectados respecto de controles sanos, y decrecimiento del tiempo de sobrevida.

Los intentos de aislamiento viral así como la búsqueda de antígenos específicos por inmunofluorescencia en los animales con respuesta tolerante, han sido exitosos a partir de casi todos los tejidos incluyendo los órganos reproductivos. Las hembras crónicamente infectadas, si bien se presentan anatómica y funcionalmente normales, resultan casi siempre estériles, debido fundamentalmente a la infección fatal de los embriones.

Por otro lado las hembras inmunocompetentes, que en algunos casos eliminan pequeñas cantidades de virus por orina, resultaron tan fértiles como los controles normales. El estudio de crías recién naci-

das antes de que realizaran su primer lactancia, demostró la presencia de pequeñas cantidades de anticuerpos neutralizantes, y estos títulos aumentaron rápidamente, alrededor de 4 veces respecto del título presentado por la madre, en la primer semana de vida. Animales destetados a los 21 días de vida, nunca fueron infectados por sus madres. Pero en los siguientes 40 días, se volvieron totalmente susceptibles a la enfermedad. Este puede ser un posible mecanismo mediante el cual se encuentran roedores normales en poblaciones donde el virus está presente en la mayoría de los individuos. (93,94)

Estos estudios experimentales del virus Machupo en Calomys callosus, demuestran muchos hechos en común con la infección del Mus musculus con virus LCM (sección 1.3.8), aunque también se encuentran diferencias significativas, entre las que podemos incluir:

- a) Ausencia de enfermedad aguda en Calomys adultos infectados.
- b) Desarrollo rápido y persistencia por largo tiempo de anemia hipercrómica microcítica en cricétidos infectados recién nacidos.
- c) Mayor reducción en el potencial reproductivo como consecuencia de la infección neonatal.
- d) Obtención de dos respuestas distintas en animales infectados después de 8 días de vida. Cerca de la mitad de los roedores tienen todos los marcadores de infección en recién nacidos, el resto desarrolla anticuerpos neutralizantes y clarifica la viremia.

1.3.2. VIRUS LASSA

La fiebre de Lassa es una enfermedad que generalmente, se presenta con cuadros muy severos, caracterizados por involucrar la mayoría de los órganos y cuyas manifestaciones son, miositosis, miocarditis, neumonitis, encefalopatía, hepatitis y diastesis hemorrágica.

Esta enfermedad fue descrita en 1969 en el noroeste de Nigeria, en la localidad de Lassa. Los estudios realizados sobre la ecología de la enfermedad, han demostrado al Mastomys natalensis, como única especie vertebrada salvaje infectada con virus Lassa. (99)

No han sido muchos los avances realizados sobre el virus Lassa y su huésped natural. Uno de los factores limitantes, es la necesidad de trabajar bajo condiciones de alta seguridad, dado que son muchos los casos de infecciones fatales de laboratorio que se han registrado. Aún así, se tienen datos de infecciones experimentales que permiten dar una idea aproximada de esta infección.

La infección de Mastomys neonatos, no causa ningún signo de enfermedad clínica o lesión histológica, a pesar de la presencia de virus en sangre, nódulos linfáticos, hígado, bazo, pulmón, cerebro, orina y secreciones de garganta por tiempo prolongado.

Este cuadro parecería apoyar la hipótesis del desarrollo de una infección tolerante persistente, . fundamentalmente por la falta de lesiones, la ausencia o aparición tardía de anticuerpos fijadores de complemento, baja eliminación viral y reactividad inmune, proveyendo estos hechos condiciones favorables para la eliminación y perduración del virus en la naturaleza .

La infección experimental de Mastomys adultos, no provoca síntomas aunque presenta altos títulos de virus en diversos órganos (nódulos linfáticos, sangre, hígado, bazo, pulmón, riñón, vejiga y cerebro), siendo muy marcado el linfotropismo viral. Algunos animales eliminan el virus de algunos órganos pero siempre existe persistencia en otros, generalmente cerebro y nódulos linfáticos. (6)

La respuesta humoral es pobre, dado que solamente el 20% de los animales desarrollan anticuerpos fijadores de complemento .

Los estudios histopatológicos, demostraron solamente algunas meningoencefalitis no muy severas, como toda anomalía.

Los estudios sobre la relación virus-huésped son todavía preliminares, y poco se conoce acerca de los mecanismos de transmisión viral. Dado que el número de animales inoculados no ha sido muy elevado y sólo fueron estudiados durante cien días, aún no se puede asegurar que en esta infección el virus clarifique lentamente, como sucede con la infección de Sigmodon hispidus con Tamiami, o si existe una respuesta de tipo dividida, como en el caso de Calomys callosus y virus Machupo.

1.3.3. VIRUS TAMIAMI

Los conocimientos actuales muestran que solamente dos arenavirus han sido aislados en América del Norte, LCM (distribuido universalmente), y el virus Tamiami, miembro del subgrupo Tacaribe.

Este virus fue aislado por primera vez en 1970 por Calisher y col, en la vereda de Tamiami en la península de Florida, donde su único huésped natural, es la rata algodонера, Sigmodon hispidus.

El virus produce una infección diseminada en el cuerpo de su huésped, pero resulta asintomática y varía con la edad del animal al momento de la exposición al virus. (97)

Si se infectan animales de 2 días de edad, y se realiza un estudio secuencial de la infección, se puede determinar la existencia de un tropismo linforeticular temprano, con mayor concentración de virus y antígeno viral en nódulos linfáticos, pulpa blanca esplénica, timo y médula osea, a los 16 días p.i.. Asimismo, se detecta infección temprana de megacariocitos.

Con posterioridad, a los 30 días p.i., se puede detectar infección en hígado y glándulas salivales, y un poco más tarde, a los 60 días p.i., una importante producción de antígenos virales en riñón, corteza adrenal, epitelio de tracto respiratorio y vejiga, aunque un poco después de los 2 meses p.i., la infectividad viral se negativiza en estos órganos.

La infección del sistema nervioso central, es poco productiva en virus infeccioso, pero los antígenos virales se detectan en gran cantidad y progresivo aumento hasta el día 90 p.i., y posteriormente se mantienen estables hasta el día 360 p.i.. (97)

En forma tardía, se pueden detectar focos de hiperplasia en retículo endotelial, y en algunos órganos blancos, pero nunca hubo evidencia alguna de citonecrosis histológica o estructural.

La eliminación de virus y antígenos virales de los tejidos de la rata algodónera, fue excepcionalmente baja. Este fenómeno estaría relacionado con una pobre respuesta celular inmune. Los mecanismos de inmunidad mediados por células, son un factor decisivo en el tipo de respuesta del huésped frente a infecciones linfotrópicas, en particular las

causadas por arenavirus. La presencia de antígenos virales en forma masiva en órganos linfóideos, sería un medio efectivo de reducir o abolir la respuesta celular.

Estudios de inmunofluorescencia realizados sobre células reticulares y linfoides de ratas algodonerías crónicamente infectadas, presentaron igual morfología que las células linfoides de ratones "carrier" infectados con LCM. Este hallazgo permitió a Murphy y col., postular que la saturación temprana de las células reticulares y linfoides con antígenos virales, sería un equivalente funcional de una zona de alta tolerancia. (51)

Posteriormente Mims, demostró que en ratones infectados con LCM, en los que se acumulan antígenos en los órganos, existe destrucción de tejido linfoide, especialmente linfocitos T, explicando así uno de los posibles mecanismos por los que se establecería una respuesta tolerante. (48)

Las observaciones realizadas sobre la cinética de eliminación de virus y antígeno viral, en Sigmodon hispidus crónicamente infectados, demostraron una recuperación tardía del sistema retículo-endotelial. Dicha recuperación fue variable según los distintos órganos. En cuanto a la respuesta inmune humoral, parece no tener ninguna importancia en el establecimiento de la infección persistente con virus Tamiami. Con la contribución de los anticuerpos neutralizantes desde el día 23 p.i., se logra clarificar la viremia completamente. Aún así no parece existir remoción alguna de antígenos virales del sistema nervioso central, aún

hasta el día 360 p.i. (51)

Los estudios realizados acerca de los mecanismos de transmisión viral, han establecido que ocurre fundamentalmente por exposición a excreciones infectadas, siendo la saliva la vía más importante de eliminación de virus.

Quando se intentó infectar animales de mayor edad (21 y 90 días) la susceptibilidad a la infección resultó prácticamente nula. Del grupo inoculado a los 21 días, se aisló virus solamente de un animal y en bajo título, mientras que en los animales de 90 días, todos los intentos de infección resultaron negativos. Los estudios de inmunofluorescencia e histología, realizados sobre los mismos animales, arrojaron resultados similares. (97)

1.3.4. VIRUS PARANA

Poco es lo que se ha estudiado acerca del virus Paraná, desde su aislamiento en 1965, a partir de los riñones de tres roedores Oryzomys buccinatus, en los bordes del río Paraná en Paraguay.

La falta de interés por este virus, tal vez sea debida a que este agente no está asociado a patología humana alguna, y que el rastreo epidemiológico realizado sobre habitantes de la zona del aislamiento y alejados de la misma, dio resultados negativos en el 100% de los casos analizados. Si bien este estudio epidemiológico se realizó sobre sólo 412 sueros, que sin ser un número muestral importante, indicaría que la población no se encuentra expuesta al virus . (92)

Con el objeto de determinar los posibles huéspedes naturales del virus Paraná, se realizaron aislamientos virales a partir de roedores capturados en la zona del primer aislamiento. Sobre un total de 6 especies cricéticas y 2 murinas, solamente se obtuvieron resultados positivos en Oryzomys buccinatus. También se practicaron estudios serológicos a partir de los sueros de los animales capturados, siendo negativos todos los intentos de dosar anticuerpos neutralizantes, inclusive en las muestras de Oryzomys buccinatus.

Si bien estos resultados son preliminares y escasos, podrían sugerir la existencia de una respuesta de tipo tolerante a la infección, en forma análoga con lo que sucede en los modelos de LCM y Machupo.

1.3.5. VIRUS PICHINDE

El virus Pichinde, fue aislado en el valle del mismo nombre en Colombia en 1965.

El aislamiento se realizó a partir de cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, glándulas salivales, suero y orina, del roedor Oryzomys albigularis.

También se pudo determinar por experimentos de capturas sucesivas de ejemplares de Oryzomys, que estos animales presentan viremia persistente, mientras que la eliminación de virus por orina no es persistente. (84)

Los estudios serológicos, demostraron la presencia simultánea de anticuerpos fijadores de complemento con virus en sangre.

En un intento de relacionar al virus Pichinde con alguna posible infección humana, se recolectaron sueros de habitantes de zonas próximas o alejadas de donde se realizaron los primeros aislamientos. Las muestras fueron ensayadas por fijación de complemento contra virus Pichinde, y sólo el 2% de las muestras fueron positivas, aunque con títulos muy bajos. (84)

1.3.6. VIRUS TACARIBE

Este virus fue aislado en 1963 en Trinidad, del murciélago Artibeus en una ocasión, y en otra oportunidad de un "pool" de mosquitos. (34)

Este agente no ha sido objeto de estudios en sus huéspedes naturales, pero si en sus aspectos bioquímicos y biológicos, dado que presenta reactividad serológica cruzada con el virus Junín, por lo que no se descarta como medio de lucha contra la Fiebre Hemorrágica Argentina.

1.3.7. VIRUS AMAPARI

Este virus fue aislado en 1964 en Serra do Navio, en el territorio de Amapá, Brasil. El aislamiento se realizó de dos especies de roedores, Neacomys guineae y Oryzomys capito.

Los estudios serológicos realizados en Oryzomys capturados en el área de Serra do Navio, mostraron que los sueros de dichos animales poseían anticuerpos fijadores de complemento, pero no neutralizantes. (63).

El virus Amaparí no ha sido asociado a ninguna patología humana, y los estudios epidemiológicos realizados en pobladores de la zona de aislamiento, arrojaron resultados negativos, por lo que se puede concluir en forma preliminar, que no existen infecciones inaparentes en humanos. (63)

1.3.8. VIRUS DE LA CORIOMENINGITIS LINFOCITARIA (LCM)

El virus LCM fue descubierto en 1934 casi simultáneamente en tres lugares distintos de los Estados Unidos. Armostrong y col., aislaron el agente de un mono que había sido inoculado con el virus de la Encefalitis de St. Louis; Rivers y Scott, aislaron 5 cepas de virus en pacientes con meningitis; y Traub reveló la presencia del virus en una colonia de ratones albinos. (85)

Aunque han existido distintas denuncias de infecciones humanas con LCM (fundamentalmente en laboratoristas), el número de casos ha sido bajo y afortunadamente muy pocos han resultado fatales.

En los primeros tiempos luego del aislamiento, se asoció al ratón blanco como huésped del virus, pero más tarde se demostró que el Mus musculus era el principal reservorio del virus en la naturaleza.

Esto fue demostrado cuando en 1939, se detectó virus en ratones grises caseros, y dichas infecciones murinas se correlacionaron con ca sos humanos de LCM en los mismos lugares. (85)

Esto fue más tarde corroborado por distintos investigadores, y en la actualidad se sabe que el mayor reservorio natural del virus es el

ratón doméstico. La transmisión del agente del ratón al hombre, aún no está aclarado. Algunos experimentos realizados con artrópodos, como vectores, han dado resultados satisfactorios pero no concluyentes al respecto. (85)

Los primeros estudios realizados en el tema de la relación virus-huésped, mostraron que existen dos tipos fundamentales de respuesta, dependiendo de la edad del animal en el momento de la infección:

a) Infección persistente con larga sobrevida, presentada por los ratones infectados congénitamente. Tales animales no muestran signos de enfermedad por muchos meses. Además tienen una elevada resistencia a la sobreinfección por vía intracerebral (i.c.). A pesar de esto, no se encontraron anticuerpos neutralizantes, aunque se detectaron ocasionalmente anticuerpos fijadores de complemento.

b) Infección aguda, presentada por animales infectados en edad adulta, seguida por una rápida eliminación del virus en los sobrevivientes. La aparición de anticuerpos fijadores de complemento, se detecta rápidamente en el suero de dichos animales, aunque la presencia de anticuerpos neutralizantes ha sido cuestionada por mucho tiempo.

RATONES INFECTADOS CONGENITAMENTE

Los ratones infectados congénitamente presentan un estado de persistencia viral, que los transforma en portadores crónicos. Dicho estado ha sido expresado como "infección tolerante persistente". El estado inmune de estos animales también recibió la denominación de "inmunidad tolerante", en contraste con la "inmunidad activa" que presentan los ratones adultos después de la infección aguda.

Los portadores crónicos parecen ratones normales por muchos meses, y gran parte de ellos a lo largo de toda su vida, a pesar de poseer grandes cantidades de virus en sus órganos, sangre y descargar virus continuamente en orina, secreciones nasales, heces, leche y esperma.

Estos animales no poseen ningún mecanismo que les permita limpiar el virus de sus organismos.

Además, en contraste con lo que sucede en la infección aguda del ratón adulto, estos ratones pueden infectar a ratones normales por contacto directo, sexualmente o durante el período de lactancia. En relación con la transmisión vertical, todos los embriones de camadas provenientes de hembras crónicamente infectadas, resultan infectados. Esta infección se produce a través del huevo, que se gesta en un medio muy contaminado con virus. Pero cuando las crías provienen de hembras sanas cruzadas con machos crónicos, no todas las camadas resultan infectadas, y en aquellas que sí lo están, no siempre se pueden detectar antígeno en todas las crías. (51)

La inmunidad de los ratones congénitamente infectados, está caracterizada por una resistencia a la infección intracerebral a lo largo de toda su vida. Dado que se sabe, que embriones y recién nacidos no son capaces de desarrollar respuesta inmune humoral o celular alguna contra el virus, la única explicación plausible para este comportamiento es que sea debido a la acción de células infectadas, mediante algún mecanismo de interferencia viral, que no sería interferón, ya que se ha demostrado la ausencia de este antiviral en los ratones "carrier".

Además este mecanismo de interferencia o bloqueo a la infección intracerebral, es débilmente activo contra otros virus que son inoculados en los mismos ratones, con lo que quedaría demostrado un fenómeno interferente selectivo.(90)

En los ratones infectados congénitamente, ha sido imposible demostrar la presencia de anticuerpos neutralizantes, aunque ocasionalmente se ha detectado la presencia de anticuerpos fijadores de complemento en bajos títulos, y también anticuerpos específicos por el uso de la técnica de inmunofluorescencia. (58)

La tolerancia inmunológica presente en estos animales dura toda su vida, pero es importante destacar, que la misma es virus específica. Esto ha sido comprobado en animales persistentemente infectados con LQM a los cuales se los ha infectado con otros virus, encontrando que los mismos desarrollan anticuerpos neutralizantes contra el nuevo agente. (58)

Aunque las respuestas a la infección de los embriones y recién nacidos son sustancialmente iguales, Traub y' col. han demostrado, la existencia de algunas diferencias entre ambos modelos. Por ejemplo, se ha encontrado que la cepa WCC de LQM es altamente virulenta para recién nacidos cuando es inoculada por vía i.c., mientras que los embriones de madres crónicamente infectadas con la misma cepa, no mostraron síntomas de enfermedad, aún cuando tenían grandes cantidades de virus en sus vísceras al momento de nacer.

Otra diferencia observada entre ambos modelos de infección, es la presencia de anticuerpos fijadores de complemento en bajo título y que

se pueden dosar más comúnmente en recién nacidos, que en los animales infectados congénitamente. (66,85)

Otro fenómeno interesante que se presenta en la infección de recién nacidos es la aparición de un "síndrome tardío", descrito por Hotchin en 1962. (29) Dichos animales aparecen aparentemente sanos por aproximadamente 10 meses, luego de los cuales se manifiestan signos de enfermedad, y finalmente mueren. Este comportamiento fue confirmado con posterioridad como una regla general, por la cual, ratones jóvenes congénitos o neonatos "carrier", que se presentan aparentemente sanos, más tarde desarrollan una enfermedad desgastante. La sintomatología de esta enfermedad se caracteriza por cambios degenerativos en ojos y piel, pérdida de motilidad; histológicamente se observan fundamentalmente afectados los riñones, lo que se correlaciona con una disfunción renal. Las lesiones observadas son, glomerulonefritis y vasculitis necrotizantes. Oldstone estableció la interrelación entre esta enfermedad y la deposición de complejos inmunes. Además se demostró que los complejos inmunes están formados por anticuerpos específicos del huésped contra las proteínas estructurales más importantes del virus, concluyendo que los complejos depositados están compuestos por viriones de LCM e inmunoglobulina G del ratón. Por otra parte el virus eluido de estos complejos resultó infeccioso. (56,57)

Con posterioridad, se intentó discernir si las alteraciones patológicas observadas en riñón eran mediadas por los complejos inmunes solamente, o debidas a injuria viral directa. Con este fin Lehmann-Gru

be, intentó la búsqueda de ratones persistentemente infectados libres de complejos inmunes. Examinando ratones domésticos que eran portadores de segunda generación, es decir, descendientes de ratones que habían sido persistentemente infectados por inoculación de homogeneizado de órganos de ratón portador salvaje. A los 12 meses, los ratones fueron sacrificados y los exámenes inmunohistológicos de riñón, plexo coroideo, piel, hígado, bazo, y sistema nervioso central, demostraron que no existían complejos inmunes, ni cambios patológicos en el 100% de los animales estudiados. Los títulos virales obtenidos de muestras de sangre y tejidos, fueron similares a los títulos de ratones adultos endocriados o exocriados, persistentemente infectados por inoculación neonatal con cepas de LCM de laboratorio, muchos de los cuales desarrollaron enfermedad por complejos inmunes.(85)

Estos resultados demostraron que el virus no causa destrucción citopática de células, ni alteraciones funcionales, sino que la patología observada es producto exclusivo de los complejos inmunes.

Otros dos hechos para remarcar en el ratón "carrier" son:

1) La existencia en forma variable, pero frecuente, de un gran número de antígenos libres, como se demuestra por métodos inmunohistoquímicos.

2) La constancia de virus en los tejidos, estableciéndose un tipo de estado estacionario entre la pérdida de virus debido a la excreción o decaimiento natural y la producción viral.

De estos dos hechos surgen dos interrogantes principales:

¿ Qué factor(es) media(n) la protección de las células que no se presentan infectadas, contra el virus infeccioso?

¿ Cómo se regula el nivel estacionario del virus en el huésped ?

Las respuestas a estos interrogantes están todavía en el campo de la especulación, y las hipótesis, aunque variadas, se pueden resumir en la combinación de los siguientes factores:

- existencia de partículas PI
- efecto de un factor genético de resistencia
- existencia de una fase refractaria de las células después de un paso de síntesis viral.

Otras causas contempladas podrían ser, como se lo ha demostrado, que distintos tejidos del ratón soporten preferencialmente la replicación de variantes virales. Estas variantes son conocidas por su capacidad de interferir con cada una de las otras, y así contribuir a la regulación. El interferón, por otro lado, pareciera no tener ningún rol, por la simple razón que no es posible detectarlo en ratones "carrier".

Además, en la respuesta del ratón a la infección con LCM es importante las características genéticas de la cepa de animales utilizados. Por ejemplo, la cepa de ratones usada por Oldstone y Dixon, produce anticuerpos rápidamente, aunque los mismos no eliminan la viremia. También sufren enfermedades inmunes tempranas y muy severas, mientras que los animales utilizados por Mims y Traub en 1939, fueron la otra punta del espectro .

Existen evidencias de que la respuesta inmune por la inoculación de LCM, así como, la susceptibilidad a la enfermedad inmunopatológica está asociada con el locus mayor de histocompatibilidad H-2. (28)

INFECCION AGUDA DEL RATON ADULTO

La infección del ratón adulto con LCM resulta en una patología con síntomas neurológicos agudos. Aquellos que se recuperan, eliminan el virus del organismo, con desarrollo de una respuesta inmune protectora.

Los estudios histológicos de los ratones agudos, demuestran la existencia de importantes infiltrados menínges, que causarían la sintomatología neurológica, a través de un efecto de presión o a causa de la presencia de una sustancia tóxica presente en el infiltrado.(74)

Esta idea fue completada más tarde por Hotchin en 1958, cuando propuso que el virus LCM es solamente patógeno para el ratón si este responde inmunológicamente a la infección, dado que es capaz de iniciar una infección persistente inaparente cuando existe tolerancia inmunológica en estos animales.(31)

Estos hechos permiten inferir, que tanto la enfermedad letal como la infección tolerante persistente, dependen de la aparición de nuevos antígenos sobre la superficie celular. Estos antígenos inducidos por el virus, estimularían un conflicto inmunológico en el ratón adulto (dirigido a la eliminación del patógeno) o se iniciaría la tolerancia inmunológica en el ratón recién nacido, lo cual permitiría por otro lado, que el virus pueda mantener una infección sin manifestaciones clínicas.

El concepto de enfermedad inmune para la infección aguda del ratón con LCM, está apoyada por la prevención en forma completa de la enfermedad mediante el uso de cortisona, radiación X, timectomía, inmunosupresores químicos y sueros antilinfocitos y antitimocitos.

Por lo tanto, los eventos básicos de la patogénesis de LCM, resultan de la elección entre las posibles alternativas de respuesta inmune que puede desarrollar el huésped. En consecuencia, dependerá de si esta respuesta es positiva, o sea inmunidad activa con supresión de virus, o negativa, como es el caso de la tolerancia o parálisis inmunológica.

Existen sin embargo, argumentos encontrados con el concepto amplio de Burnet y Fenner, de tolerancia inmunológica para la infección con LCM. Esta alternativa liderada por Oldstone, propone la existencia de una "tolerancia dividida". Esta posición está sustentada en la existencia de anticuerpos contra los principales componentes virales, formando parte de los complejos inmunes o circulando libremente, en los ratones "carrier".

Otro hecho de importancia, es la respuesta obtenida en ratones adultos inoculados con altas dosis de virus (dosis inmuno-paralizantes) o tratados con sueros antilinfocítico o antitimocítico, en los que se encuentran altos títulos de anticuerpos fijadores de complemento e inmunofluorescentes, pero no neutralizantes. Además, bajo estos tratamientos se establecen infecciones persistentes, marcando claramente que la respuesta humoral no previene la viremia, y que la supresión viral sólo ocurre como resultado de una respuesta de tipo celular.

También se ha observado que inoculando ratones adultos inmunocompetentes, los anticuerpos neutralizantes aparecen recién cuando el virus ha sido suprimido, o sea, meses después de la infección. Todo esto llevó a postular la existencia de una "tolerancia dividida", en la que el compartimiento inmunológico B o humoral, sería reactivo. (56)

Por lo tanto, se puede concluir que la alternativa de que un animal adulto infectado muera o se recupere, se debe al balance entre dos factores interdependientes:

1) la existencia de las modificaciones inducidas por el virus sobre la superficie de las células de los órganos considerados blanco.

2) la eficiencia del proceso de inducción inmune, que llevará a la generación de linfocitos T efectores, que removerían y destruirían las células modificadas.

Como ya se expresó anteriormente, el último punto es tal vez la piedra angular del mecanismo de prevención de la enfermedad en los animales "carrier" (congénitos o recién nacidos), o sea la inhibición de la respuesta inmune de los linfocitos mediada por virus. Numerosos aislamientos han demostrado pequeñas cantidades de virus persistiendo en el sistema retículo-endotelial, lo que podría causar el citado efecto.

Lehmann-Grube ha postulado un mecanismo por el cual el virus infecta específicamente a los linfocitos T programados en su contra, a través de receptores específicos. Este proceso llevaría a la destrucción temprana de los clones de linfocitos T, impidiendo su amplificación y posterior respuesta. Esta teoría fue fundamentada sobre la base

de que las células T de ratón lactante pueden ser infectadas por LCM, mientras que las mismas de ratón adulto son refractarias a la infección. (67)

1.3.9. VIRUS JUNIN

La población rural del centro de nuestro país, esta expuesta desde hace aproximadamente 30 años a una enfermedad infecciosa endemo-epidémica de etiología viral, llamada Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), más comunmente conocida como "mal de los rastrojos".

La sintomatología clínica se caracteriza por hipertermia, con alteraciones hematológicas, cardiovasculares, digestivas, renales y neurológicas.

La mayoría de los pacientes se recuperan de la enfermedad, pero aproximadamente el 15% muere.

Si bien esta nueva enfermedad tenía antecedentes como tal desde 1953, se supone que los primeros brotes se produjeron en 1943, siendo enmascarados por otras enfermedades de sintomatología similar. Pero fue en 1958, en que simultáneamente los grupos del Dr Parodi y del Dr. Pirotsky, aislaron el virus a partir de sangre y órganos de pacientes internados en el Hospital Regional de la ciudad de Junín, nombre con que se denominó al virus. (60,65)

La relación biunívoca, enfermedad-agente etiológico, se estableció en base al aislamiento del virus, lo cual se consiguió al hallar animales sensibles para la propagación del mismo, detección de anticuerpos específicos contra el virus en sueros de convalecientes y por la ino-

culación voluntaria en humano. Este último experimento, reprodujo la enfermedad natural, y posteriormente se pudo recuperar el agente causal de la sangre del voluntario.

Los casos de FHA registrados hasta 1958 provenían de un área relativamente pequeña de la pampa húmeda del noroeste de la provincia de Buenos Aires (16.000 km²). Posteriormente, la región endemoepidémica se extendió año a año, llegando en la actualidad a 100.000 km².

(42) (ver figura 2)

La expansión del área endémica, implicó el consiguiente aumento en el número de habitantes expuestos a la infección, llevándolo de 25.000 en 1958 a más de 1.000.000 de habitantes en 1982.

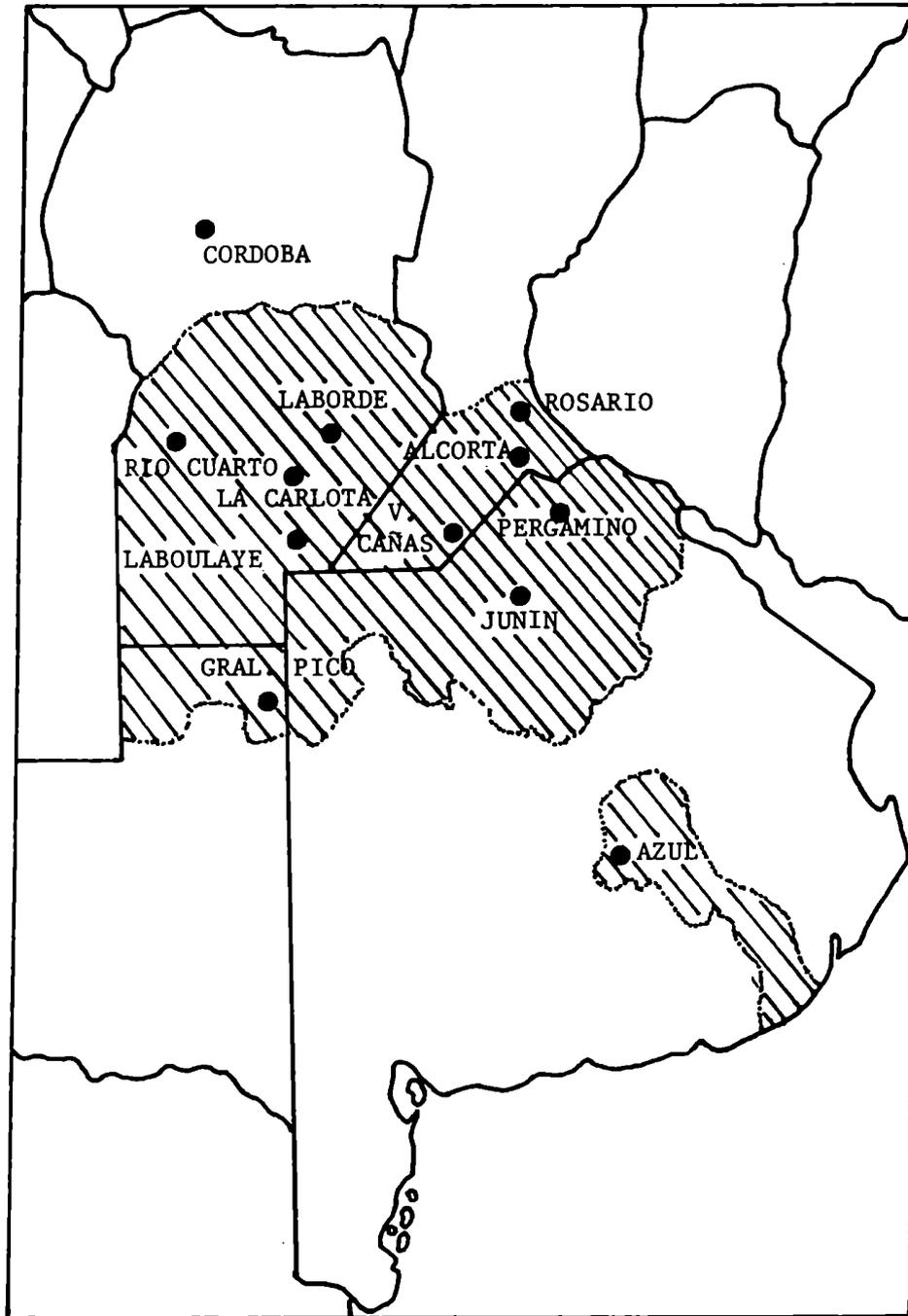
La mayor parte de los pacientes son trabajadores rurales, especialmente aquellos que desempeñan sus tareas en campos cultivados con maíz, sorgo o girasol. Por otro lado, la época de cosecha de estos cereales, coincide con los picos epidémicos de la enfermedad, entre abril y junio, que además concuerda con una mayor densidad de roedores, especialmente del género *Calomys*, en las mismas áreas rurales.
(75,87)

Los estudios realizados para determinar los reservorios naturales del virus, condujeron al aislamiento del agente infeccioso a partir de ácaros y roedores de la zona endémica. (59,61,76) Posteriormente, no se pudo demostrar la importancia de un artrópodo como vector en la transmisión del virus desde el reservorio roedor al hombre.

Mediante estudios realizados a campo por los equipos de Parodi(59) y Sabbattini (75,76), se demostró la importancia de los cricétidos cam-

FIGURA 2

AREA ENDEMICA DE FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA



pestres en el ciclo natural del virus Junín. Si bien el virus se aisló a partir de tres especies (Akodon azarae , Calomys laucha y Calomys musculinus), la última especie demostró ser la más importante en la cadena epidemiológica, dado el elevado número de aislamientos positivos obtenidos a partir de dichos animales. Otro hecho que señala a esta especie, es su dominancia numérica sobre las otras dos mencionadas.

Kravetz y col, han realizado importantes aportes en este último aspecto, o sea, la ecología y el control de los roedores involucrados en la FHA. Estos estudios demuestran que la fauna de la zona endémica, presenta distintas especies de cricétidos (Akodon, Oryzomys y Calomys). Si bien, las especies del género Akodon son las más abundantes en ambientes estables, la actividad agrícola, con las modificaciones edáficas que ella involucra, determina la destrucción de cuevas y variaciones en el hábitat natural, que afecta fundamentalmente a dicho género. Estas modificaciones ecológicas permiten que en los campos cultivados se seleccione con mayor facilidad la especie C. musculinus, que es la que tiene mayor capacidad de incremento poblacional, quedando las otras especies relegadas a los bordes de dicho hábitat, que se mantienen estables. (36)

Este fenómeno, así como la elevada susceptibilidad del C. musculinus a contraer infecciones persistentes con virus Junín, lo han señalado como el principal reservorio natural del virus.

Otro estudio similar, realizado en la Provincia de Córdoba, por

Sabattini y col., demostró que el género C. laucha era numéricamente dominante en la estructura de la comunidad de roedores. Este hecho, juntamente con los elevados títulos de virus obtenidos de isopados bucales de estos animales, hacen pensar en este género como una alternativa o segundo reservorio respecto del C. musculinus.

Los conocimientos sobre la relación virus-huésped, han tenido en el equipo de la Dra. Sabattini los principales aportes, y están basados fundamentalmente en el esclarecimiento de los aspectos ecológicos y biológicos, que influyen en el mantenimiento del virus en la naturaleza. Especialmente se han estudiado los aspectos relacionados con las vías de eliminación y transmisión del virus entre los roedores, más que aquellos relacionados con los mecanismos íntimos que determinan la persistencia viral en el organismo del huésped.

Los estudios realizados, se han basado en experiencias de captura, liberación y recaptura, y por inoculación experimental de cricétidos libres de virus.

Con el objeto de establecer la importancia de las vías de eliminación viral, se estudiaron muestras de orinas e isopados bucales de roedores atrapados en el área endémica. Se detectó viruria solamente en la especie C. musculinus, en tanto que los intentos de aislamiento viral a partir de isopados bucales, fueron positivos en un número importante de animales pertenecientes a cuatro especies distintas (C. musculinus 64/230; C. laucha 21/98; A. azarae 3/76 y Mus musculus 2/32) (76). Además se observó que los animales crónicamente infectados pre-

sentan viremias persistentes.

Trabajos previos de la misma autora, demostraban que la proporción de aislamientos positivos a partir de sangre, órganos o isopados bucales, tiene importantes variaciones en su efectividad según la época de captura de los animales, siendo la más propicia la que coincide con los meses de mayor incidencia de la FHA.

Los estudios realizados con animales infectados experimentalmente, involucraron distintas especies de roedores. Se dedicó especial interés al estudio virológico de los órganos, dado que se habían encontrado altos títulos de virus en los cerebros de animales que no presentaban viremia al momento de la captura, demostrando "a priori", un balance entre la capacidad del virus para replicar en el roedor y la habilidad de la respuesta inmune para clarificarlo.

Los experimentos realizados con A. azarae adultos, inoculados por vía i.p. o i.c., tuvieron resultados negativos tanto en los intentos por detectar virus en sangre u órganos, así como, antígenos fijadores de complemento. Los estudios serológicos demostraron la presencia de anticuerpos fijadores de complemento a partir del día 10 p.i.. (76)

Quando se inocularon A. azarae de 6 a 8 días de edad, se obtuvieron resultados similares a los anteriores, aunque la respuesta de anticuerpos fijadores de complemento fue un poco más tardía (30 días).

Tambien se realizaron inoculaciones experimentales en el género A. obscurus. Con este modelo, se obtuvo una respuesta humoral temprana, pero la eliminación de virus por saliva, así como, la presencia de viremia, fue en casi todos los ejemplares estudiados negativa. Por otro lado, los conocimientos de la infección natural de esta especie con virus Junín no son suficientes, dado que son muy raras las capturas de estos animales.

Los resultados obtenidos con la inoculación experimental de C. musculus neonatos, demuestran el alto potencial de la especie como reservorio del virus Junín. Si bien los experimentos se realizaron con un número pequeño de animales, la mayoría de ellos presentaron virus en cerebro, sangre e hisopado bucal.

La importancia de las glándulas salivales como órgano blanco de la multiplicación viral, quedó demostrado definitivamente en un trabajo realizado por Martínez Peralta y col. (43,44)

El estudio se realizó analizando los órganos de C. musculus infectados naturalmente en cautividad, por contacto con animales previamente infectados por vía i.n..

Sobre seis animales estudiados, dos desarrollaron viremias crónicas y bajos títulos de anticuerpos fijadores de complemento. Además presentaron altos títulos de virus en glándulas salivales.

Los estudios de microscopía electrónica, demostraron la existencia de partículas virales en glándulas salivales, cerebro y hepatocitos aislados. El resto de los animales presentaron viremias leves solamente en los primeros momentos de la infección y todos ellos desa-

rrollaron anticuerpos fijadores de complemento.

Los estudios realizados para determinar las vías de transmisión, demostraron que la transmisión horizontal por contacto directo es la más importante. No se observó infección congénita, y solamente se observó transmisión vertical post-natal. (76)

2. OBJETIVOS

Los estudios realizados para combatir la FHA, están dedicados fundamentalmente al desarrollo de vacunas que prevengan la enfermedad. Si consideramos, que la cadena epidemiológica de la enfermedad está constituida por dos eslabones principales: el hombre y el Calomys musculinus (reservorio natural), se observa que poco o nada se ha hecho para cortar dicha cadena al nivel del eslabón roedor.

La idea que fundamenta este trabajo de tesis, es el estudio de la infección persistente del Calomys musculinus con virus Junín, en base a objetivos que no se pueden alcanzar en los experimentos realizados a campo.

Con este fin, se propuso un sistema experimental basado en la inoculación del Calomys musculinus con la cepa atenuada XJ Cl₃ de virus Junín.

El objetivo principal, es la caracterización de la respuesta persistente del cricétido infectado, esperando que los resultados de esta investigación puedan contribuir a la lucha contra la enfermedad. Además, se intentará obtener información que ayude a la comprensión de los fenómenos de persistencia viral "in vivo", y poder convertir este sistema en modelo de infección crónica; aportando conocimientos de implicancia biológica de carácter primario.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Virus

3.1.1. Virus Junín:

Se utilizó la cepa atenuada de virus Junín denominada XJ Cl₃ (18), mantenida en el laboratorio por pasajes en cerebro de ratón blanco.

La cepa fue utilizada en el pasaje 13 posterior a su clonado, con un título aproximado de 10⁸ UFP/ml en células Vero.

3.1.2. Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV)

Se trabajó con la cepa Indiana. Los stocks se prepararon en células Vero o L. Se cosechó el virus del sobrenadante de los cultivos a las 24 hs p.i.. Los títulos fueron del orden de 10⁸ UFP/ml en células Vero.

3.2. Animales

3.2.1. Calomys musculinus

Los C. musculinus utilizados en este trabajo, provinieron de la colonia establecida en nuestro laboratorio en el año 1980. La misma fue originada a partir de 4 parejas de animales, provistas gentilmente por la Dra. Marta Sabattini, que eran parte de una colonia iniciada con animales capturados en zonas libres de FHA.

La caracterización citogenética, bioquímica y de parámetros morfométricos de la colonia, fueron realizados por D' Aiutolo y col (11), confirmando que los cricétidos pertenecían a la especie Calomys musculinus.

Los cricétidos se crían actualmente en el bioterio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Los apareamientos se efectúan en forma exogámica, de forma de imitar las condiciones naturales de reproducción de este roedor.

Los intentos de iniciar una cepa endocriada, no han superado la cuarta generación, tras la cual no se ha podido obtener apareamientos exitosos.

Se ha establecido que el período de gestación es de 20 a 21 días y que el tiempo óptimo de destete de las crías, no debe superar los 23 días.

El plantel de animales, se ha organizado siguiendo las normas utilizadas en el bioterio del Instituto Nacional de Farmacología para otros roedores. Se tienen dos planteles de producción, uno monogámico que provee los animales que enriquecen la colonia, y otro poligámico de donde se obtienen los animales para experimentación.

Se ha notado que estos cricétidos son muy sensibles a cambios térmicos, así como, a elevados niveles de ruido, lo que se traduce en una disminución de la producción de crías. Por dichas razones, se ha debido climatizar la sala donde se encuentra el plantel de animales, a una temperatura aproximada a los 23°C, así como, tratar de minimizar los ruidos externos al recinto.

La colonia es controlada periódicamente para descartar posibles infecciones persistentes con virus Junín o LCM. Con este objeto se sacrifican animales elegidos al azar, y se toman muestras de sangre y encéfalo. Estas muestras son homogeneizadas e inculadas en ratones lactantes o adultos por vía i.c.. Así mismo, se realizan pesquisas de

anticuerpos neutralizantes anti-virus Junín en los sueros de los mismos animales.

3.2.2. Ratones

Se utilizaron ratones albinos, cepa OF₁, de 24 - 48 hs de vida para aislamientos y titulaciones de virus, y además para la preparación de los stocks de virus Junín.

3.3. Cultivo de tejidos

3.3.1. Células Vero

Se utilizó la línea continua proveniente de riñón de mono verde africano, Cercopithecus aethiops, denominada Vero.

La línea fue mantenida por repiques semanales en medio MEM (medio esencial mínimo de Gibco), adicionado con 5% de suero de ternera inactivado, y 50 ug/ml de gentamicina.

Esta línea se usó para preparar los stocks de virus en cultivo de tejidos, y para la titulación de los materiales en estudio por el método de unidades formadoras de placas bajo agar. Se la empleó entre los pasajes 150 y 200. El medio de mantenimiento usado fue MEM, adicionado con 3% de suero de ternera inactivado, y 50 ug/ml de gentamicina.

3.3.2. Células L-929

Para determinar la presencia de interferón en los animales infectados, se utilizó la línea continua de fibroblastos de ratón L-929, dada su sensibilidad al interferón de dicho animal.

La línea se mantuvo por repiques cada 3 o 4 días, utilizando medio MEM suplementado con 10% de suero de ternera inactivado, y 50 ug/ml de gentamicina.

3.4. Preparación de stocks de virus Junín

a) En cerebro ratón blanco

Ratones albinos de 24 a 48 hs de edad, fueron inoculados por vía i.c., con 0,02 ml de medio de cultivo que contenían 10^3 dosis letales 50% para ratón (DL_{50}) de virus Junín.

Los animales inoculados, se sacrificaron por decapitación al 7° día p.i.. Se cosecharon los cerebros, con los que se preparó un homogeneizado al 10% p/v en una solución tamponada de fosfatos (PBS) isotónica de pH 7,4, suplementada con 10% de suero de ternera.

La suspensión se centrifugó a 10.000g, durante 45 minutos, utilizando el sobrenadante como fuente de virus. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

El stock se fraccionó en alícuotas de 0,5 ml y se almacenó a -70°C, determinándose su infectividad por el método de unidades formadoras de placas bajo agar y/o dosis letal 50% para ratón blanco.

Por otra parte, se comprobó la esterilidad bacteriológica, antes y después del proceso de fraccionamiento, sembrando 0,2 ml de muestra en caldo tioglicolato y caldo nutritivo.

b) En células Vero

Células Vero en confluencia, se inocularon con virus Junín con una multiplicidad de infección de 0,1 UFP/cél. Se dejó adsorber durante 1 h a 37°C, con agitación periódica. Luego se descartó el inóculo y se cubrieron las monocapas con medio de mantenimiento. Como fuente de virus se cosecharon los sobrenadantes a las 72-96 hs. Con el obje-

to de eliminar los restos celulares, los sobrenadantes se centrifugaron durante 15 min a 1.800 g.

El stock se fraccionó, almacenó y controló su esterilidad, como se explicó en el punto anterior.

3.5. Procesamiento de las muestras de sangre y suero

Los animales fueron sangrados a través del plexo venoso retro-orbitario inmediatamente antes del sacrificio.

La sangre obtenida, se fraccionó en 2 alícuotas. Una de ellas, se almacenó a -70°C , para los posteriores estudios de viremias. La alícuota restante, se mantuvo a 4°C durante 24 hs, luego se centrifugó a 2500 g por 15 min. y se recogió el sobrenadante. El suero, así obtenido, se fraccionó y se conservó a -20°C , para su utilización en los estudios serológicos.

3.6. Estudios serológicos: Prueba de neutralización

Estos estudios se llevaron a cabo utilizando la técnica de neutralización, suero variable-virus constante.

Para realizarla, se diluyeron los sueros 1/5 en medio de mantenimiento, y se inactivaron a 56°C durante 30 min. Luego, se diluyeron sucesivamente al medio o al tercio, desde 1/5 hasta la dilución conveniente para cada muestra ensayada.

Posteriormente, se mezclaron volúmenes iguales de virus Junín (conteniendo 1000 UFP/ml), con las diluciones de suero a ensayar. y se incubaron 1h a 37°C . Simultáneamente, se incubaron mezclas controles, de virus con suero de C. musculus sin infectar.

Al finalizar el período de neutralización, se midió la infectividad residual por el método de titulación de unidades formadoras de placas bajo agar.

Los títulos de los sueros se expresaron como la inversa de la máxima dilución que reduce el 80% de las placas respecto del control.

3.7. Aislamiento y titulación de virus

Las muestras de órganos (cerebro, riñón, corazón, pulmón, adrenales, timo, glándulas salivales, bazo, ganglios linfáticos, hígado y páncreas) de los distintos animales que fueron utilizados para aislamiento y titulación viral, se homogeneizaron al 10% p/v en PBS suplementado con 5% de suero de ternera.

Las suspensiones obtenidas, se centrifugaron a 10.000 g por 45 min, en frío. Los sobrenadantes se fraccionaron y fueron conservados a -70°C hasta su utilización.

Los aislamientos virales se realizaron inoculando ratones albinos de 24-48 hs, por vía i.c. con 0,02 ml de la muestra. Los animales se controlaron durante 21 días, registrándose la morbimortalidad.

Los aislamientos fueron considerados positivos, cuando los ratones presentaban los signos neurológicos característicos de la encefalitis producida por el virus Junín (lateralización de la marcha, parálisis y muerte)

Las titulaciones de virus, se realizaron utilizando alterna-

tivamente los siguientes métodos:

a) Unidades formadoras de placas bajo agar

Se utilizó el método de Damonte y Coto (12), con algunas modificaciones.

Monocapas confluentes de células Vero, crecidas en botellas de 15 cc de capacidad, se infectaron con diluciones decimales crecientes del material al titular. El volumen inoculado fue 0,2 ml/botella, el que se dejó adsorber durante 1h a 37°C, con agitaciones periódicas. Luego se descartaron los inóculos, y las monocapas se cubrieron con 3 ml de medio nutritivo. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente, y posteriormente las botellas se incubaron invertidas a 37°C por un período de 7 días; finalmente las células se fijaron con formol al 10% durante 30 min, y se descartó la capa de agar lavando suavemente con agua corriente. Las monocapas así fijadas, se tiñeron agregando una solución de cristal violeta al 1% que se mantuvo durante 15 min, lavándose 2 veces con agua corriente, dejando escurrir antes de contar las placas.

Se utilizaron 2 botellas por dilución, y los títulos se calcularon en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Título (UFP/ml)} = \frac{N}{V \times D}$$

siendo N= número promedio de placas

V= volumen del inóculo

D= dilución inoculada

El medio nutritivo usado para cubrir las células es el siguiente:

volúmenes iguales de agar 2% en agua bidestilada y medio MEM adicionado con 5% de suero fetal bovino inactivado.

b) Dilución al punto final

Se efectuó inoculando ratones blancos (cepa OF₁) de 24 - 48 hs, con 0,02 ml de diluciones seriadas al décimo de la muestra a titular, por vía i.c.

Se utilizaron lotes de 9 ratones por dilución. Estos animales se observaron durante 21 días, registrando la aparición de sintomatología típica producida por virus Junín.

Los títulos se expresaron en DL₅₀/ml, calculándolos por el método estadístico de Reed y Muench. (71)

3.8. Estudios anatomopatológicos e inmunohistoquímicos

Con el objeto de investigar lesiones en los distintos órganos de los C.musculus infectados, así como, antígeno viral en los mismos, se practicaron estudios anatomopatológicos e inmunohistoquímicos, que fueron realizados por los Dres. Rubén P. Laguens y R. Martín Laguens, de la Cátedra de Patología II, de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de La Plata.

Para observar los tejidos al microscopio de luz, los órganos fueron fijados en solución de Bouin, incluidos en Paraplast y coloreados con Hematoxilina Eosina, siguiendo los procedimientos habituales.

Para detectar antígenos virales, se tomaron muestras sin fijar que fueron congeladas en CO₂ y cortadas a 4 um en un criostato. Los cortes fueron incubados con suero humano, proveniente de un paciente convalesciente de FHA, con un índice neutralizante de 6 logaritmos. Luego los cortes fueron lavados y tratados con suero de cabra anti-inmunoglo-

bulinas totales humanas, marcado con isotiocianato de fluoresceína de origen comercial (Cappell Laboratories, Cochranville, Pa.). Los cortes fueron examinados en un sistema de epiiluminación Leitz, con lámpara de halógeno y con un filtro K-510.

Como control se incubaron cortes alternados con suero humano no inmune o bloqueando la reacción con sueros anti-virus Junín de cobayo, antes de la aplicación del suero humano inmune.

3.9. Esquemas experimentales

Los diferentes esquemas experimentales serán detallados en la sección resultados.

3.10. Caracterización de las poblaciones virales presentes en C. musculus infectados con virus Junín

3.10.1. Determinación de variantes termosensibles

Los homogeneizados de cerebro o glándulas salivales de C. musculus con aislamiento positivo en ratón lactante, se titularon por formación de placas bajo agar en células Vero, a 37°C y 40°C simultáneamente.

Con los títulos obtenidos se calculó la eficiencia de plaqueo (EDP), como la relación:

$$\underline{\text{título a } 40^{\circ}\text{C} / \text{título a } 37^{\circ}\text{C} = \text{EDP}}$$

Se consideró que la población viral estudiada tenía características ts, cuando presentaba EDP menor a 0,1.

Como control se tituló el stock de virus parental a ambas temperaturas.

3.10.2. Determinación de variantes serológicas

Se realizaron ensayos de neutralización enfrentando el suero de un animal persistentemente infectado, con la población viral aislada del cerebro o glándulas salivales del mismo animal. Al mismo tiempo, se determinó el título de anticuerpos neutralizantes de dicho suero con el stock de virus Junín parental.

La metodología operativa se detalló en la sección 3.6.

3.11. Obtención de clones virales

Con el objeto de obtener poblaciones genéticamente puras se utilizó la técnica de clonado viral.

Monocapas de células Vero infectadas con las muestras de virus a clonar, se procesaron por el método de unidades formadoras de placas bajo agar, como se detalló en la sección 3.7.. Las muestras se inocularon suficientemente diluidas, de forma de evitar superposición de placas.

A los 6 días p.i. se agregó a cada monocapa 2 ml de una mezcla de agar 2% y rojo neutro 1:2000 (concentración final). El colorante se dejó difundir 24 hs a 37°C en oscuridad.

A los 7 días p.i. se observaron y marcaron las placas a clonar. Con pipeta Pasteur se picó el agar y se resuspendió en 0,5 ml de medio de mantenimiento. Luego de 1 h a 4°C, el material resuspendido se inoculó por duplicado en monocapas de células Vero crecidas en tubos de ensayo. El material se dejó adsorber 1h a 37°C. Posteriormente, se agregó medio de mantenimiento y se incubó un tubo a 37°C y su duplicado a 40°C.

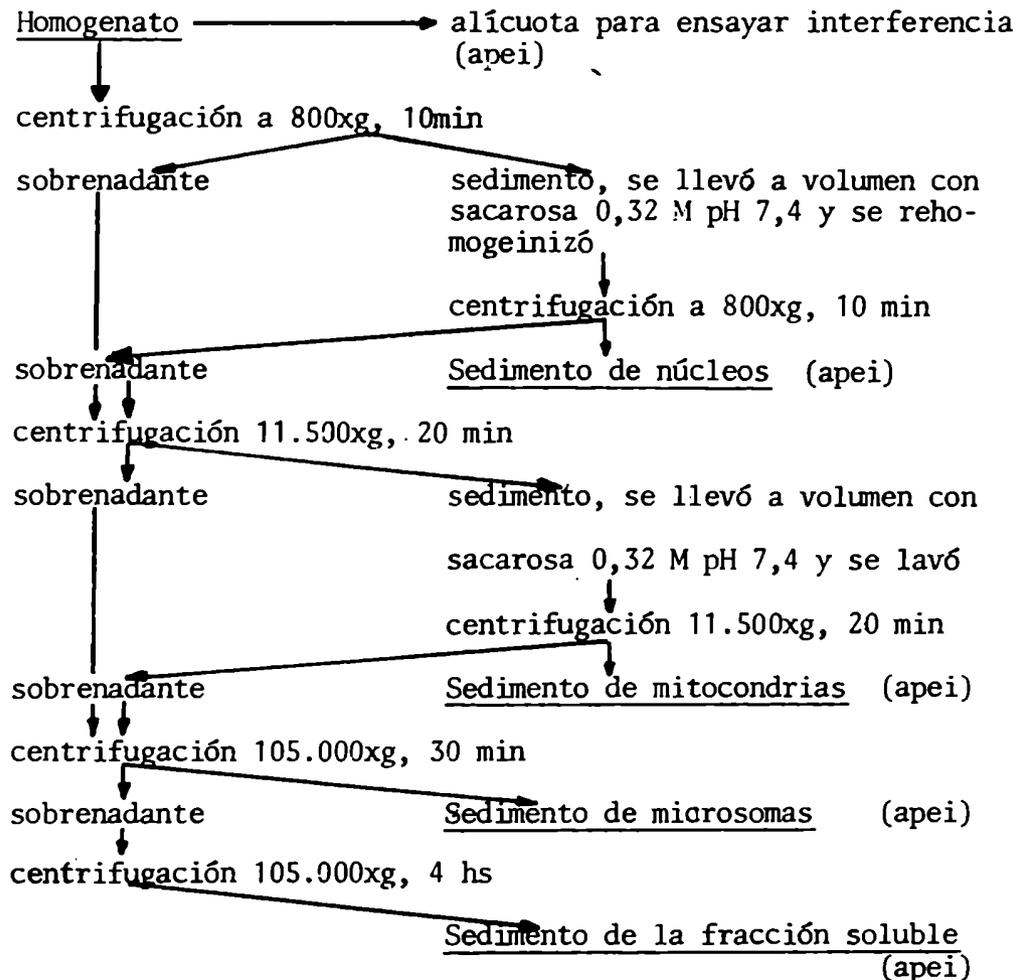
Los tubos fueron observados diariamente y al desarrollarse acción citopatogénica se cosecharon los sobrenadantes y se congelaron a -70°C . Posteriormente estos materiales fueron titulados por unidades formadoras de placas bajo agar.

3.12. Fraccionamiento subcelular

El procedimiento se realizó siguiendo la técnica descrita por Coto y col. (9)

Los cerebros de C.musculus se lavaron con solución fisiológica, se suspendieron al 33% en solución de sacarosa 0,32M pH 7,4, y se homogeneizaron con un mortero manual.

El esquema de fraccionamiento fue el siguiente:



Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron en una centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-20, las restantes se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Beckman L-2, rotor SW 27.

Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

Las distintas alícuotas para ensayar interferencia (apei), se almacenaron a -70°C hasta su uso.

3.13. Ensayos de interferencia viral

La técnica utilizada para medir la actividad interferente viral de los diferentes materiales en estudio, se basaron en la observación de la inhibición de la producción de placas del virus estándar en cultivo de tejidos.

El procedimiento se realizó siguiendo la técnica descrita por Help y col (23), con algunas modificaciones.

Monocapas confluentes de células Vero, fueron inoculadas con diluciones decimales crecientes del material a ensayar. El volumen inoculado fue 0,2 ml/monocapa, dejándolo adsorber durante 1 h a 37°C con agitaciones periódicas. Luego se descartó el inóculo y se lavó la monocapa con PBS pH 7,4 (1, 2 ó 3 veces según el experimento). Posteriormente se inoculó 0,2 ml de una dilución de virus que contenía 500 UFP/ml, dejando adsorber 1 h a 37°C con agitaciones periódicas. Se retiró el inóculo y se procesó las monocapas siguiendo la técnica de unidades formadoras de placas bajo agar.

Simultáneamente se infectaron cultivos controles con virus o la muestra en estudio solamente.

La interferencia se expresó como el porcentaje del número de placas producidas en la monocapa tratada con el material ensayado (I), respecto del número de placas producidas por el virus estándar solo (E), es decir:

$$\% \text{ actividad interferente} = I / E \times 100$$

El error del método, calculado en forma experimental, es de aproximadamente un 5%, lo cual equivale a una diferencia de \pm 5 placas cada 100.

3.14. Tratamiento proteolítico de suspensiones de cerebros

Se mezclaron 0,8 ml de suspensión de cerebro al 1% y al 10% (p/v) en PBS, con 0,4 ml de tripsina 1% en medio de cultivo sin suero.

La mezcla se incubó 1 h a 37°C y luego se agregaron 3 gotas de suero bovino, incubando 15 min a 37°C, para inactivar la acción enzimática .

Posteriormente, se ensayó la actividad interferente de la mezcla como se describió en la sección 3.13.

Como controles se incubaron mezclas de suspensión de cerebro con medio de cultivo sin enzima, y tripsina con PBS.

3.15. Tratamiento lipolítico de suspensiones de cerebros

Se mezclaron 1,8 ml de homogeneizado de cerebros 10% (p/v) en PBS, con 0,2 ml de cloroformo durante 20 min con agitación constante a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a baja velocidad y se colectó la fase acuosa, diluyéndola diez y cien veces en PBS. Posteriormente se ensayó la actividad interferente de ambas diluciones. La fase

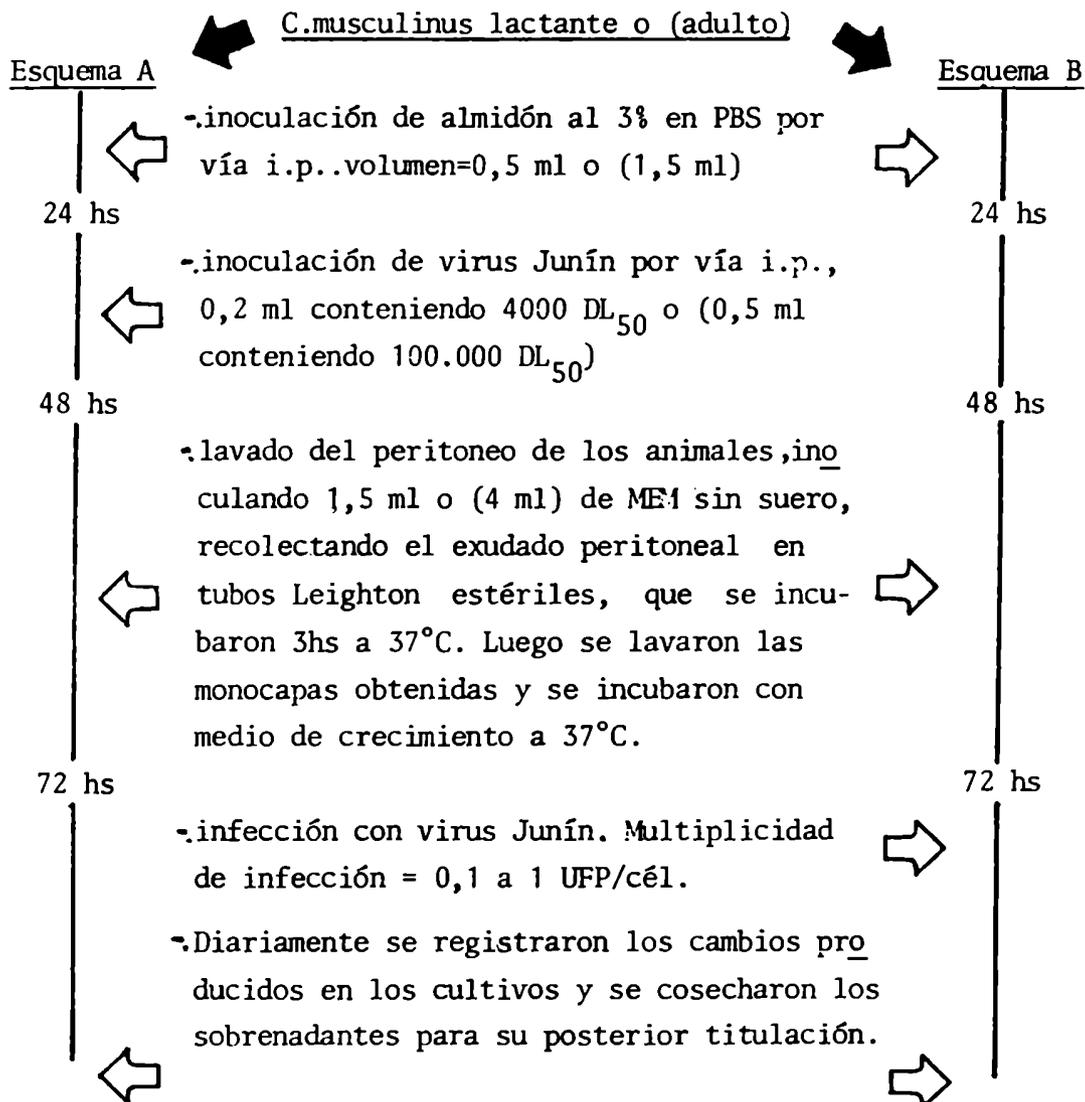
acuosa no fue utilizada sin diluir, debido a la toxicidad del cloroformo disuelto en dicha fase; sobre las monocapas celulares.

Como control se realizaron mezclas de 1,8 ml de homogeneizado de cerebros con 0,2 ml de PBS, sometiéndolas al mismo procedimiento experimental que las muestras tratadas con cloroformo.

3.16. Obtención de macrófagos peritoneales de C. musculus

La obtención de macrófagos peritoneales se realizó siguiendo el procedimiento descrito por González y col (16), con algunas modificaciones.

Se utilizaron C. musculus lactantes de 5 días o adultos de 60 días de edad. El esquema experimental fue el siguiente:



3.17. Purificación de interferón

Homogeneizados de bazos de *C. musculus* al 10% en PBS, se centrifugaron a baja velocidad para eliminar restos celulares. Los sobrenadantes se sometieron a un procedimiento de rutina para probar la presencia de interferón alfa.

Las muestras se acidificaron a pH 2 con ClH (0,1 N), y se mantuvieron en esas condiciones durante 4 días a 4°C en envases plásticos. Posteriormente, los materiales se neutralizaron con HONa (0,1N) y fueron centrifugados a 100.000 g durante 1,5 hs. El sobrenadante obtenido se ensayó como interferón.

3.18. Determinación de actividad de interferón

Células L-929 crecidas en botellas de 15 cc de capacidad se incubaron durante 24 hs con los sobrenadantes obtenidos en la sección 3.17, o con medio de mantenimiento como control. Luego se descartó el sobrenadante y los cultivos fueron infectados con virus VSV (0,1 UFP/cél) A las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes de los cultivos tratados y de los controles, que se titularon por unidades formadoras de placas bajo agar en células Vero.

Se consideró actividad de interferón positiva, cuando existía una reducción mayor o igual al 80% del número de placas presentado por el control.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACION DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DEL *Calomys musculinus* NEONATO

4.1.1. SUSCEPTIBILIDAD DEL *C.musculinus* A LA INFECCION CON VIRUS JUNIN. INFLUENCIA DE LA DOSIS Y VIA DE INOCULACION

El objetivo de la primera parte de este estudio era establecer infección persistente en *Calomys musculinus* con virus Junín, para poder definir en una segunda etapa sus características.

Se tenían como antecedentes los estudios realizados por Sabattini y col (76), infectando experimentalmente *C. laucha* y *C. musculinus* con cepas de virus Junín aisladas de la naturaleza, por vía i.c. o i.n.. Durante estos experimentos no se detectaron signos de enfermedad o muerte, cualquiera fuera la vía de inoculación o edad del animal utilizado. Además se estableció que con dosis iguales o superiores a 10^3 DL₅₀, se lograba establecer infección persistente en casi todos los animales inóculados. Con dosis inferiores en cambio, la respuesta fue variada, detectando en la mayor parte de los animales conversión serológica por fijación de complemento, pero no se pudo aislar virus de sus organismos.

Tomando estos resultados como punto de partida se decidió realizar un estudio preliminar de susceptibilidad a la infección, inoculando cricétidos neonatos con distintas dosis de virus y por diferentes vías, con la intención de determinar las condiciones óptimas para el establecimiento de una infección persistente.

La vía i.n. fue considerada la más adecuada ya que era la que mejor remedaba las vías naturales de infección; pero debido a los problemas de manipulación con animales tan pequeños, existe una gran incertidumbre en la dosis real de virus que cada cricétido recibe, por lo cual se descartó su uso.

En consecuencia, se decidió utilizar la vía i.p., dado que si bien no puede ser considerada una vía de infección natural, era la vía menos artificial de que se disponía.

Por otro lado, la cepa atenuada XJ Cl₃ de virus Junín elegida para realizar este trabajo, ha presentado históricamente un comportamiento altamente neurotrópico en todos los animales de experimentación utilizados en las investigaciones relacionadas con la FHA. Este hecho sumado a que uno de los órganos blanco en la infección natural del C. musculinus con virus Junín es el cerebro (76), plantearon la necesidad de ensayar también la vía i.c..

Grupos de aproximadamente 50 animales, entre 5 y 7 días de edad, fueron inoculados con 0,02 ml de medio de cultivo conteniendo 4000 DL₅₀ de virus Junín, por vía i.p. o i.c.. Los cricétidos inoculados fueron revisados diariamente durante 3 meses, registrándose síntomas de enfermedad o muertes. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Comparando los resultados obtenidos por ambas vías se observa que la incidencia de la enfermedad fue aproximadamente similar, pero el porcentaje de mortalidad obtenido por la vía i.c. fue ligeramente superior al presentado por la vía alternativa.

Tabla 1

Respuesta de C. musculus de 5 a 7 días de edad a la inoculación con 4000 DL₅₀ de virus Junín por vía i.p. o i.c.

Vía	N° de animales inoculados	% animales enfermos	% animales muertos
i.p.	59	83	54
i.c.	49	86	67

Por otro lado, aunque la vía i.p. no refleja la vía de entrada del virus en la infección natural, se consideró oportuno realizar nuestros estudios descartando la vía i.c. por ser de carácter exclusivamente experimental.

Con el objeto de determinar la influencia de la dosis de virus sobre la respuesta del cricétido a la infección, un grupo de 30 animales de 5 a 7 días de edad fue inoculado por vía i.p. con 0,02 ml de medio de cultivo conteniendo 400 DL₅₀ en lugar de 4000 DL₅₀.

La respuesta a la nueva dosis mantuvo aproximadamente los mismos porcentajes que los obtenidos con la dosis mayor, obteniéndose 82% de morbilidad y 55% de mortalidad.

En vista de que los resultados obtenidos con ambas dosis fueron similares, se decidió continuar los experimentos con la mayor de ellas (4000 DL₅₀ por vía i.p.), dado que la misma era de igual magnitud que

la menor dosis efectiva utilizada en las infecciones experimentales con cepas virulentas (1000 DL₅₀), lo cual permitiría posteriormente una mejor comparación de los resultados.

4.1.2. SUSCEPTIBILIDAD DEL C. musculus DE DISTINTAS EDADES A LA INFECCION CON VIRUS JUNIN POR VIA INTRAPERITONEAL

La enfermedad y muerte de los animales inculados con la cepa XJ Cl₃ fue un resultado sorprendente dado que no existía ninguna evidencia anterior de que el virus Junín causara alguna patología en sus reservorios naturales.

Estos resultados plantearon la necesidad de investigar la susceptibilidad a la infección en función de la edad de los animales al momento de la infección.

Con este fin, grupos de por lo menos 50 animales de distintas edades (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 y mayores de 20 días) fueron inculados por vía i.p. con 0,02 ml de medio de cultivo conteniendo 4000 DL₅₀ de virus Junín.

Los cricétidos inculados fueron revisados diariamente durante 3 meses, registrándose síntomas de enfermedad o muerte.

Los animales respondieron en tres formas características, (ya presentadas por los cricétidos de 5 días de los experimentos anteriores):

- 1) animales que no presentaban síntomas
- 2) animales que enfermaban y morían
- 3) animales que se recuperaban de la enfermedad

Sin embargo, la respuesta cuantitativa de los animales a la infección varió según la edad en el momento de ser inoculados.

Los resultados se presentan en la figura 3. Se observa que se detectaron síntomas de enfermedad en todos los grupos de animales menores de 11 días; pero la incidencia de la enfermedad decreció con el aumento de la edad de los cricétidos al momento de la infección, siendo máxima para el grupo de 1 a 2 días de edad (92 %), decreciendo gradualmente hasta llegar a un 70% para el grupo de 8 a 11 días de edad.

La mortalidad se mostró también dependiente de la edad, siguiendo el perfil mostrado por la morbilidad. Los valores máximos se obtuvieron en el grupo de animales más pequeños, alcanzando el 71 %, disminuyendo posteriormente hasta un 37 % en el grupo de mayor edad.

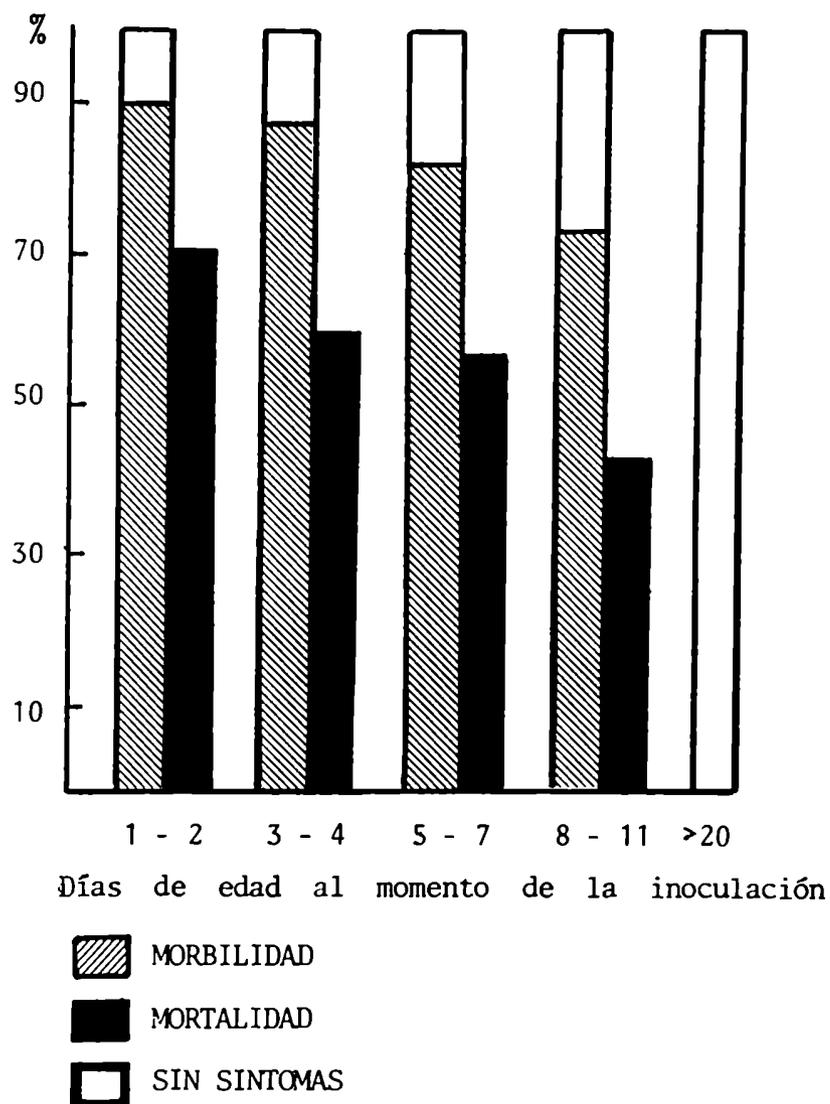
Un hecho interesante, fue la falta de enfermedad y muerte en el 100% de los animales mayores de 20 días de edad.

4.1.3. DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD

Los síntomas clínicos de la enfermedad fueron fundamentalmente neurológicos y de intensidad variable. Las primeras manifestaciones estuvieron caracterizadas por una disminución en los reflejos y erizamiento del pelo. Progresivamente los animales mostraron una acentuada lateralización en la marcha, acompañada de temblores y/o convulsiones. Estas manifestaciones fueron espontáneas o provocadas por estímulos externos, como por ejemplo después de someter a los cricétidos al "spin test" (prueba que se realiza tomando el animal por la cola, haciéndolo girar boca abajo por unos segundos).

FIGURA 3

MORBIMORTALIDAD DE *C. musculus* INOCULADOS CON 4000 DL₅₀ DE VIRUS JUNIN POR VIA I.P., EN FUNCION DE LA EDAD AL MOMENTO DE LA INFECCION.



Durante las convulsiones, los miembros posteriores se encontraban rígidamente hiperextendidos (figura 4 a y b). Llegado a este estadio de la enfermedad se observaron dos evoluciones, muerte o recuperación. En algunos animales la hiperextensión de los miembros traseros se hizo permanente, no respondiendo más a los estímulos externos, adoptando al morir una postura típica con el lomo arqueado (figura 4b).

Otros animales en cambio, se recuperaron paulatinamente sin mostrar síntomas aparentes, mientras que otros quedaron afectados presentando sus reflejos disminuidos o por el contrario hiperexcitación.

Otras características observadas en animales recuperados o no, fue su menor crecimiento, respecto de animales hermanos inoculados simultáneamente pero que no enfermaron, llegando esta diferencia a manifestarse en una reducción del peso corporal del orden del 50%.

El día de aparición de los primeros síntomas de enfermedad fue dependiente de la edad de los animales al momento de la inoculación (figura 5).

Cuando los cricétidos fueron infectados antes de los 5 días de vida, algunos animales mostraron síntomas alrededor del día 6 p.i. y otro grupo entre los días 13 y 16 p.i. (figura 5 a y b).

La inoculación de animales entre 5 y 7 días de edad presentó también dos picos de morbilidad, pero el segundo de ellos estuvo retrasado en una semana comparativamente con los grupos de menor edad

FIGURA 4



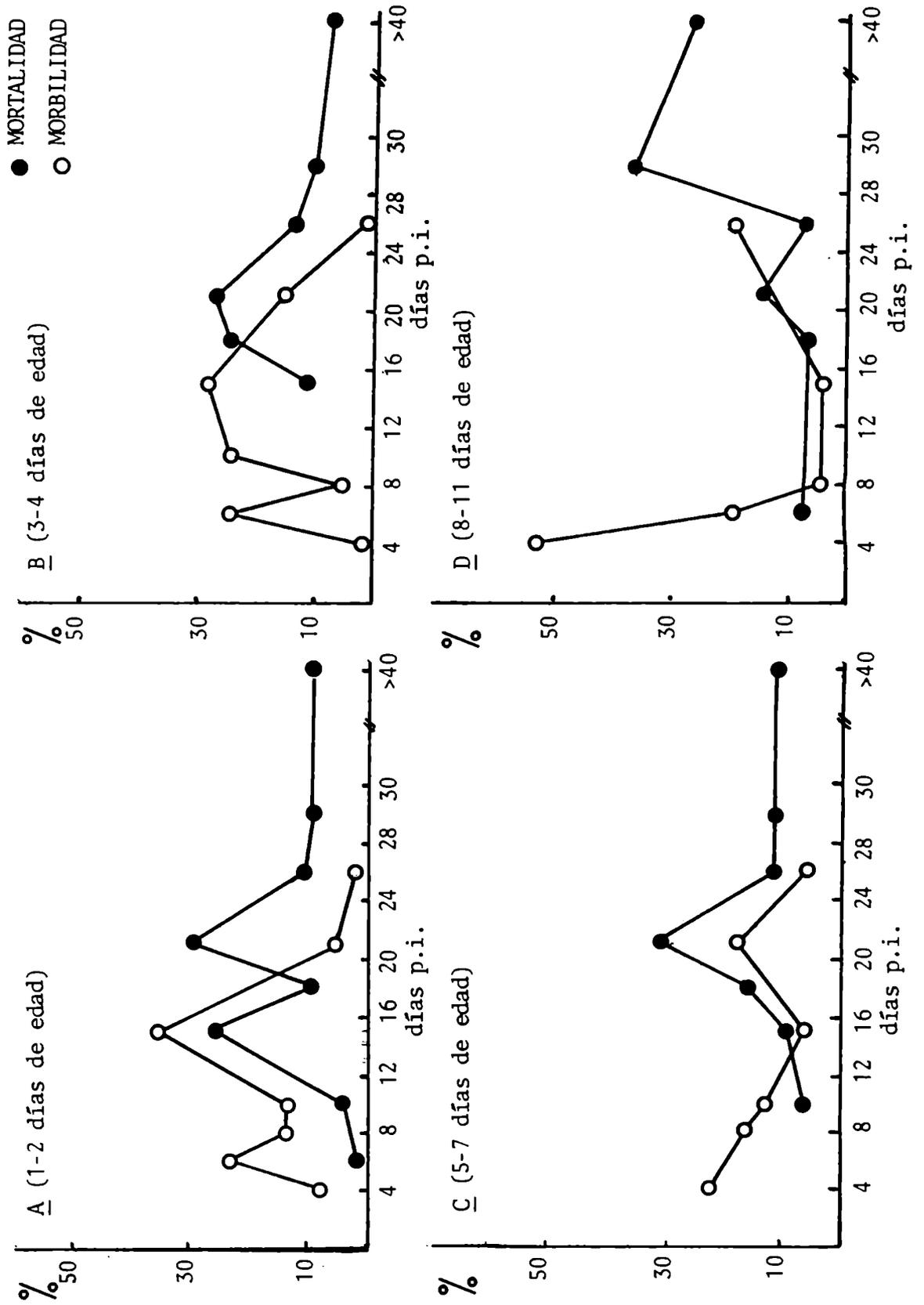
A) C. musculinus a los 21 días p.i.
(inoculado a los 3 días de edad
por vía i.p. con 4000 DL₅₀ de V.
mostrando hiperextensión de los
miembros traseros después de ser
sometido al "spin test"

B) C. musculinus hermano del cricétido
de la figura 4A, a los 21 días p.i.
en un estadio previo a la muerte.
Se observan los signos típicos de
la enfermedad, pelo erizado, lomo
arqueado y parálisis del tren pos-
terior.



FIGURA 5

MORBIMORTALIDAD DE *C. musculus* DE DISTINTAS EDADES INOCULADOS CON 4000 DL₅₀ DE VIRUS JUNIN POR VIA I.P.



(figura 5 c).

El grupo de C. musculus de mayor edad susceptible a la infección , 8 a 11 días de edad, presentó su mayor incidencia de morbilidad entre el 4to y 5to día p.i. (figura 5 d).

La muerte de los animales estuvo siempre precedida por síntomas neurológicos. La mortalidad tuvo su mayor incidencia entre los días 20 y 22 p.i. para todos los grupos , con la excepción de los animales infectados entre 8 y 11 días de edad, los que murieron en mayor porcentaje alrededor del día 30 p.i. (figura 5a, b, c, y d).

Resulta difícil explicar el comportamiento presentado por los distintos grupo de animales. Posiblemente las diferencias observadas sean el resultado de la interacción de sistemas inmunes con distintos grados de desarrollo y los mecanismos de diseminación viral.

Como se puede observar en la figura 5, existe una clara tendencia a disminuir la morbilidad en los animales inoculados alrededor de los 5 a 7 días de vida, y este hecho se podría correlacionar con una mayor madurez del sistema inmune.

4.1.4. PATOGENESIS DE LA INFECCION

Frente a los resultados obtenidos, se decidió caracterizar la infección aguda del C. musculus neonato, con el objeto de comprender las rutas que derivarán en el establecimiento de una infección persistente.

4.1.4.1. INFECCION AGUDA

El estudio del estadio agudo de la enfermedad, se planteó sobre la base de los análisis virológicos, serológicos y anatomopatológicos realizados sobre un grupo de 90 animales inoculados con 4000 DL_{50} por vía i.p. entre el 1er y 3er día de vida. Los cricétidos fueron sangrados y sacrificados a distintos tiempos p.i..

4.1.4.1.1. AISLAMIENTOS VIRALES

En esta primera etapa de la infección perinatal solamente se pudo rescatar virus a partir de cerebros y en forma más esporádica de glándulas salivales. Los demás órganos estudiados (riñón, corazón, pulmón, adrenales, timo, bazo, hígado y pancreas) fueron rutinariamente negativos.

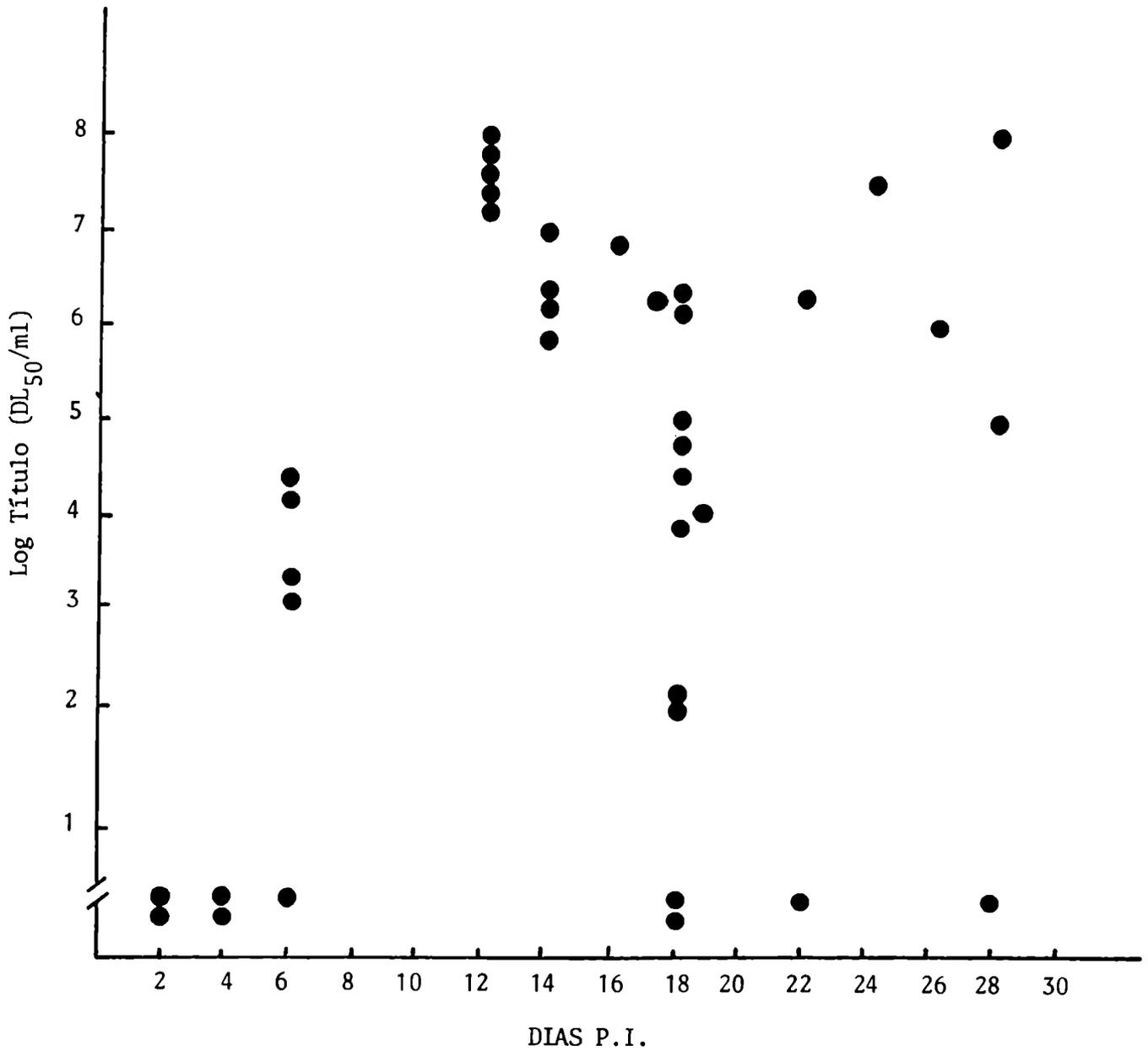
La figura 6 muestra los títulos virales obtenidos a partir de los cerebros de los animales sacrificados hasta el día 30 p.i.

El virus se detectó a partir del día 6to p.i., en títulos del orden de 10^3 DL_{50}/ml . Los valores máximos se obtuvieron alrededor del día 11 p.i., en el orden de 10^7 DL_{50}/ml , coincidentemente con la aparición de viremia y de síntomas neurológicos (figura 5). Luego los valores descienden distribuyendose desde valores del orden de 10^6 DL_{50} hasta 10^2 DL_{50}/ml .

El análisis de la curva de crecimiento de la figura 6 no es sencillo, dado que no todos los animales tienen una misma respuesta. Mientras algunos cricétidos presentan altos títulos de virus aún hasta el día 30 p.i. (momento a partir del cual se los considera persistentemente infectados), otros animales presentan aislamientos negativos. Estos últimos, pertenecerían al grupo de animales que cursan la etapa aguda

FIGURA 6

AISLAMIENTO DE VIRUS JUNIN A PARTIR DE CEREBROS DE *C. musculus* INFECTADOS PERINATALMENTE POR VIA I.P. Y SACRIFICADOS EN LOS PRIMEROS 30 DIAS P.I.



en forma asintomática y que posteriormente estarán inmunizados al virus Junín, como se describirá más adelante.

Los intentos de aislamiento de virus a partir de glándulas salivales fueron negativos hasta el día 20 p.i. Posteriormente se obtuvieron resultados positivos, aunque en un bajo porcentaje de las muestras estudiadas. Los títulos obtenidos fueron del orden de 10^4 DL_{50}/ml .

Los estudios virológicos realizados sobre muestras de sangres demostraron que el 50% de los animales inoculados presentaban viremia, tuvieran o no sintomatología clínica al momento del análisis.

La tabla 2 resume los casos de viremias positivas, los cuales se comenzaron a detectar a partir del día 6to p.i., con títulos máximos alrededor del día 13 p.i.

La viremia se clarificó en la mayoría de los casos alrededor del día 30 p.i., coincidentemente con la presencia de anticuerpos neutralizantes. En algunos animales estudiados más allá del día 30 p.i., que fueron sangrados periódicamente, se pudo demostrar la existencia de viremias fugaces aún cuando tenían niveles altos de anticuerpos neutralizantes.

4.1.4.1.2. ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS

Los estudios histológicos en animales clínicamente enfermos, demostraron : meningoencefalitis con destrucción de grandes áreas cerebrales.

TABLA 2

AISLAMIENTOS DE VIRUS A PARTIR DE SANGRE DE C.musculus SACRIFICADOS
DURANTE LA ETAPA AGUDA DE LA INFECCION*

DIA DE SACRIFICIO	TITULO DE VIRUS (log DL ₅₀ /ml)
6	2,35
6	2,45
11	2,94
11	2,60
13	2,34
13	3,20
13	3,25
17	2,82
18	2,60
18	2,34
18	2,26
23	3,20
28	2,45
28	2,35

*: solamente se incluyen los animales con viremia positiva.

Las lesiones más severas se observaron en cerebros que presentaban destrucción de las sustancia gris y blanca. Así mismo, se determinó la existencia de coroiditis e infiltrados perivasculares. En las cercanías de las áreas de necrosis se observaron macrófagos y movilización de la microglía.

El cerebelo presentó una meningitis leve y un retraso en la migración de las células granulares, con la consecuente atrofia lamelar (figura 7).

En los animales aparentemente sanos, aquellos que no presentaban sintomatología neurológica, se observaron dos situaciones diferentes. Algunos cricétidos mostraban un infiltrado mononuclear leve con preferente localización perivascular; mientras que otros no presentaron lesiones.

Los estudios morfológicos realizados en los demás órganos no demostraron alteraciones.

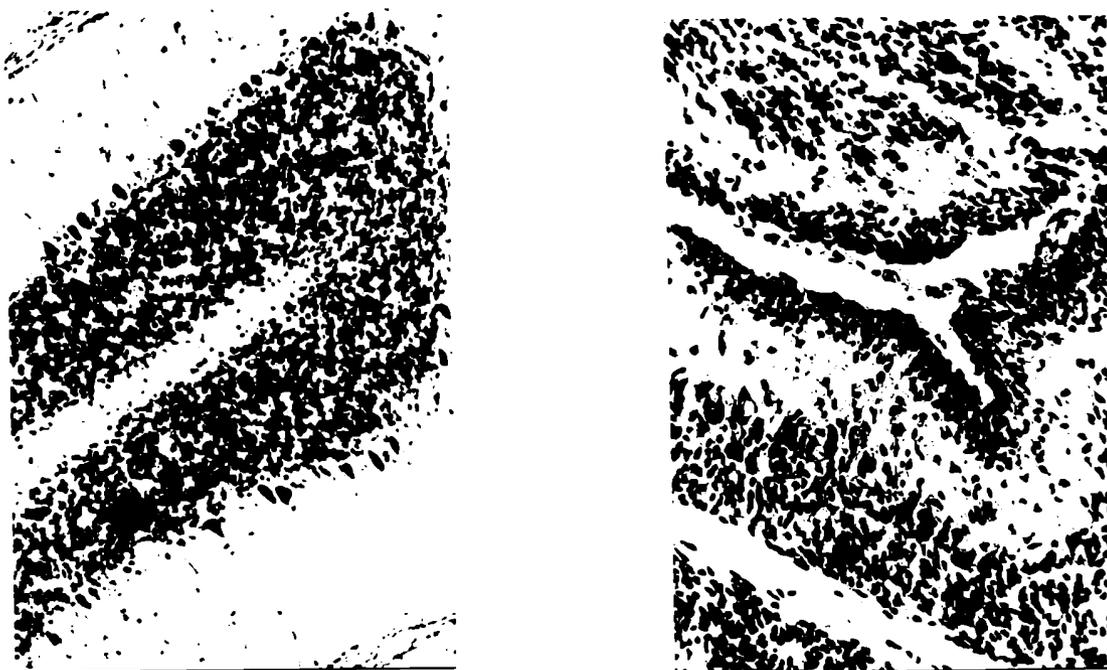
4.1.4.1.3 DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOFUORESCENCIA

Por técnicas de inmunofluorescencia fue posible detectar antígenos virales en hígado, tejido linfático, pulmón, glándulas salivales, y encéfalo a partir de los primeros momentos de la infección.

El tejido linfático mostró fluorescencia positiva en células con morfología similar a los elementos pertenecientes al sistema reticular-monocítico. Esta fluorescencia no fue intensa y se pudo observar sólo hasta el día 11 p.i. en la totalidad de los animales examinados.

El hígado presentó escasas células positivas en la luz sinusoidal y sólo pudieron ser detectadas hasta el día 14 p.i. en 2 de 10 anima-

FIGURA 7



7 A: Corte cerebelar de un animal control

7 B: Corte cerebelar de un cricétido infectado con virus Junín, de la misma edad que el animal de la figura anterior . Se observa un retraso en la migración de las células granulares y atrofia lamelar.(H&E x 200).

les estudiados.

El pulmón mostró escasas células septales con fluorescencia positiva entre los 3 y 9 días p.i. en 2 de 7 animales analizados.

Las glándulas salivales mostraron fluorescencia en el borde apical de las células acinares y en la luz de los conductos, recién a partir del día 20 p.i. en 4 de 10 muestras examinadas.

Por el contrario, el examen de encéfalo por medios de esta técnica mostró una intensa fluorescencia en neuronas corticales y en los núcleos de la base en forma granular, así como también, en pequeños vasos sanguíneos de la corteza, en casi la totalidad de los animales estudiados y desde momentos tempranos de la infección. El cerebro mostró también fluorescencia positiva intensa en la capa granulosa, pero sólo en 15 de 20 animales estudiados.

4.1.4.1.4. SEROLOGIA

Con el objeto de establecer la cinética de aparición de la respuesta inmune humoral, se intentó el dosaje de anticuerpos neutralizantes circulantes a partir de muestras de sangre obtenidas por punción retroocular de los animales infectados.

Si bien el método de sangrado ha demostrado ser el más eficiente de los utilizados, el escaso volumen de sangre obtenida de C. musculinus menores de 30 días (0,2 a 0,4 ml/animal). hizo imposible el intento de dosaje de anticuerpos en muchas de las muestras obtenidas.

Sobre 35 animales sacrificados para este estudio, solamente se obtuvieron 8 muestras con cantidades suficientes de suero para rea

lizar las pruebas de neutralización.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3, donde se observa la aparición temprana de anticuerpos neutralizantes, ya al día 11 p.i., aunque no ha sido posible determinar su presencia con anterioridad debido a los problemas para implementar la técnica serológica con muestras de animales más jóvenes.

Resulta importante destacar que todos los animales estudiados en este trabajo, así como los utilizados en trabajos relacionados con el con el presente, han tenido respuesta humoral positiva frente a la infección con virus Junín.

Otro hecho llamativo, fue la presencia conjunta de viremia y anticuerpos neutralizantes en el mismo animal. Este fenómeno estaría relacionado con la patogénesis de la enfermedad y será tratado en la discusión.

4.1.4.2. ROL DE LOS MACROFAGOS PERITONEALES (Mfp) EN LA INFECCION EXPERIMENTAL DEL Calomys musculinus POR VIA i.p. CON VIRUS JUNIN

La inoculación de C. musculinus con virus Junín por vía i.p., es seguida por una rápida diseminación viral, con producción de encefalitis, a causa de la cual un porcentaje importante de los animales muere.

Cuando esta misma inoculación se practica en cricétidos adultos, no se registra morbimortalidad. (figura 3)

El mismo fenómeno de resistencia a la infección por vía i.p. en función de la edad se ha descrito para otros modelos virales, por ejemplo Herpes simple-ratón (25), Fiebre amarilla-ratón (101).

TABLA 3

RESPUESTA HUMORAL DE C.musculus NEONATOS INFECTADOS CON VIRUS JUNIN

DIA p.i.	AISLAMIENTO DE VIRUS DE CEREBRO	VIREMIA	TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES
11	+	-	120 ^a
13	+	+	40
13	+	+	120
17	+	+	240
18	+	+	720
23	+	nh	320
26	+	nh	320
28	+	+	320

a: título de anticuerpos neutralizantes = inversa de la última dilución de suero que inhibió el 80% del número de placas respecto del control de virus con suero normal.

Las evidencias acumuladas sugieren que la maduración del macrófago podría ser uno de los factores que contribuirían al fenómeno de la susceptibilidad variable en función de la edad.

Aún así, la información acerca del papel del macrófago en la patogénesis o en la defensa de las enfermedades virales no es suficiente.

Por otro lado, el macrófago no cumpliría el mismo papel en todas las infecciones virales. Mientras existen evidencias que demuestran que estas células fagocitan y digieren virus (especialmente cuando están acomplejados con anticuerpos)(46,73,78,86), otros trabajos han descrito la existencia de adsorción, penetración y multiplicación de algunos virus en macrófagos.(46,73,86)

Los arenavirus y en particular el virus Junín, han demostrado tener un tropismo linfo-reticular, tanto en sus huéspedes experimentales así como en los naturales.

Gonzalez y col(16), demostraron que Mfp de ratón blanco pueden ser infectados in vitro con cepas virulentas o atenuadas de virus Junín, produciendo altos títulos de virus sin aparente daño celular. Otra particularidad de los cultivos de Mfp infectados, fue su larga vida in vitro respecto de cultivos controles sin infectar.

Además, el patrón de producción de virus de los Mfp infectados, fue similar al presentado por otros cultivos celulares infectados persistentemente con virus Junín.

Estos hechos señalan al Mf como posible blanco de la replicación viral en infecciones in vivo.

En consecuencia, se intentó investigar la posible relación entre la susceptibilidad a la infección y el Mfp como posible barrera inmunológica o como célula blanco de la infección.

Con este objeto se estudio la interacción del virus Junín con Mfp de C.musculus neonato o adulto. El análisis se planteó desde dos puntos de vista:

a) la infección de cultivos de Mfp in vitro, que serviría para establecer la susceptibilidad de estas células para ser infectadas en ausencia del entorno inmunológico que tiene en el organismo.

b) el estudio virológico de los sobrenadantes de cultivos de Mfp obtenidos de animales previamente infectados, demostrando así su función como barrera inmunológica o como sustrato para la multiplicación viral.

Siguiendo los procedimientos descriptos en Materiales y Métodos, se prepararon cultivos de Mfp de C.musculus (neonatos o adultos) infectados 48 hs antes del lavado peritoneal o a partir de animales sanos. Los exudados peritoneales que se obtuvieron de cada animal tenían entre 10^7 y 10^6 células, luego de la incubación y lavados detallados anteriormente. el número de células adheridas al vidrio fue de 10^6 a 4×10^5 células .

Los cultivos obtenidos de animales sanos, fueron infectados un día después de la cosecha.

En consecuencia, se disponía de cuatro tipos de cultivos :

1.- Mfp de neonatos infectados in vivo

2.- Mfp de neonatos sanos, infectados in vitro

3.- Mfp de adultos infectados in vivo

4.- Mfp de adultos sanos, infectados in vitro

Los sobrenadantes de todos los cultivos fueron cosechados diariamente y titulados por unidades formadoras de placas.

Los cultivos de Mfp permanecieron viables hasta el día 15 aproximadamente, luego el número de células comenzó a decrecer.

Los resultados se graficaron en las figuras 8a, b, c y d. Los distintos puntos de estas figuras son el promedio de los resultados de tres cultivos obtenidos de animales distintos.

Se puede observar en la figura 8a y 8b, que el virus Junín replica tanto en Mfp de neonatos infectados in vivo como in vitro. Si bien se obtuvieron títulos más altos para los Mfp infectados in vivo, los cultivos infectados in vitro siguen el mismo patrón de infección.

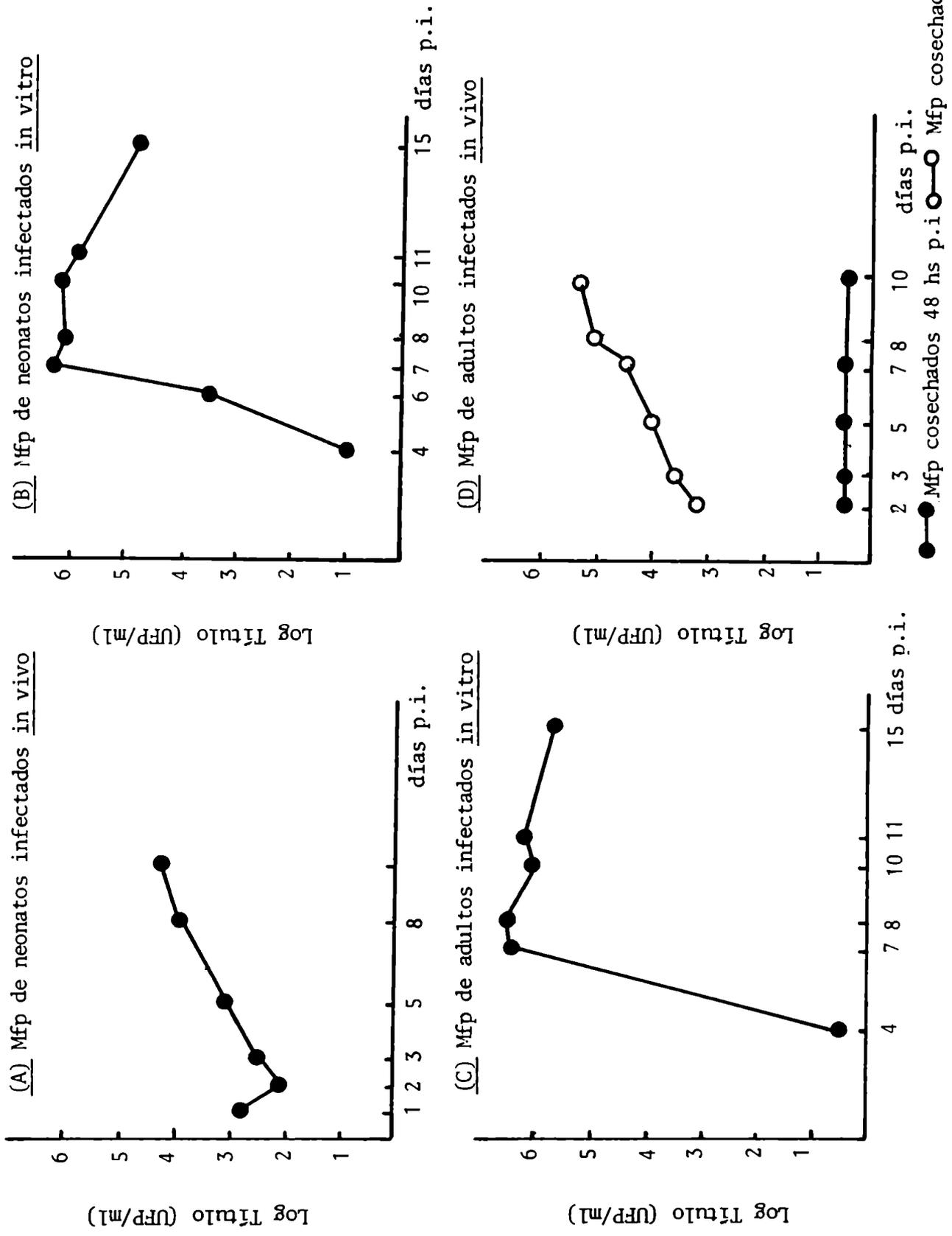
Como se observa en la figura 8c, la infección in vitro de Mfp de adultos fue productiva, y la curva de crecimiento obtenida presenta un perfil similar a la de los cultivos de Mfp de neonatos.

Pero los sobrenadantes de cultivos de Mfp de adultos infectados in vivo fueron negativos en todas las muestras cosechadas a distintos tiempos. Sólomente se obtuvieron resultados positivos cuando los Mfp fueron cosechados 24 hs después de la infección de los animales, en lugar de 48 hs p.i. (figura 8d).

Los resultados obtenidos sugieren una relación directa entre la madurez del macrófago peritoneal y la resistencia a la infección, dado

FIGURA 8

CURVAS DE CRECIMIENTO DE VIRUS JUNIN EN MACROFAGOS PERITONEALES DE Calomys musculinus



que mientras los Mfp de neonatos son infectados in vivo y sirven posiblemente para diseminar el virus, eludiendo así otros mecanismos de defensa, los Mfp de adultos son resistentes a la infección in vivo.

La respuesta negativa de los Mfp de adultos infectados in vivo sería concomitante con la existencia de un factor(es) que mediaría la resistencia a la infección. La acción de este factor cesaría o no estaría presente in vitro, dado que los Mfp de adultos sanos inoculados in vitro son susceptibles a la infección.

La existencia de este factor(es) estaría relacionado con la madurez inmunológica del animal, debido a que el virus Junín replica en Mfp de neonatos infectados tanto in vitro como in vivo.

Además, este factor ejercería su acción sobre los Mfp aproximadamente 48 hs p.i., dado que los sobrenadantes de cultivos de adultos infectados in vivo y cosechados 24 hs p.i. son productores de virus, mientras que aquellos obtenidos a las 48 hs p.i. no lo son, demostrando que los mismos son resistentes a la infección y posiblemente ejercen una acción virucida que impediría el desarrollo de la infección.

4.1.5. INFECCION PERSISTENTE

El estudio de la infección persistente se realizó sobre 106 C. musculus. Estos cricétidos fueron los sobrevivientes, de un total de 353 animales neonatos infectados con 4000 DL₅₀ por vía i.p., que superaron la etapa aguda de la infección.

Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos p.i., a partir del día 31 y hasta el día 560 p.i..

4.1.5.1. AISLAMIENTOS VIRALES

Los intentos de recuperar virus Junín de órganos de animales que superaban la etapa aguda de la infección, solamente tuvieron éxito cuando se realizaron a partir de cerebros y con menor importancia a partir de glándulas salivales.

En la figura 9 (continuación de la figura 6), se muestra la distribución de los títulos de virus aislado a partir de cerebros de C. musculus en función del tiempo de sacrificio de los animales. El virus que se detectó en niveles máximo durante la etapa aguda de la enfermedad, luego se va estabilizando para mantenerse alrededor de 10^5 DL₅₀/ml.

El virus pudo ser aislado de los cerebros de animales que tenían 350 días p.i. al momento del sacrificio.

Otros aislamientos, sin embargo, fueron negativos y correspondieron a animales que no habían presentado síntomas de enfermedad durante la etapa aguda de la enfermedad.

Por otro lado, se intentó demostrar el papel que tenían las glándulas salivales en la infección persistente, dada su importancia como vía de contaminación ambiental por medio de la saliva. Con este fin se practicaron aislamientos a partir de glándulas salivales de animales que habían presentado o no virus en cerebro. Este estudio fue realizado en base a los resultados obtenidos por Martínez Peralta y col (43,44) con C. musculus infectados naturalmente con cepas de campo. En estos trabajos se había demostrado la importancia de las glándulas

salivales como órgano de multiplicación viral, aún cuando los intentos de aislamiento de virus a partir de otros órganos fueron negativos.

En el presente trabajo se analizaron 26 muestras, y se obtuvieron 11 aislamientos positivos, con títulos entre 4×10^2 y 8×10^5 DL₅₀/ml. La tabla 4 resume los resultados de estos aislamientos en función de la presencia o ausencia de virus en los cerebros de los animales cuyas glándulas salivales se estudiaron.

TABLA 4

AISLAMIENTOS VIRALES DE GLANDULAS SALIVALES DE C. musculus QUE SUPERARON LA ETAPA AGUDA DE LA INFECCION

VIRUS EN CEREBRO	AISLAMIENTO DE VIRUS JUNIN DE GLANDULAS SALIVALES	
	POSITIVO	NEGATIVO
POSITIVO	10	11
NEGATIVO	1	4

Los resultados demuestran que aproximadamente el 50% de los cricétidos con virus en cerebro presentaron sus glándulas salivales infectadas, mientras que sobre cinco animales que no tenían virus en cerebro solamente uno tenía virus exclusivamente en glándulas salivales.

Comparando estos resultados con los obtenidos por Martinez Peralta y col., se encuentra una nueva diferencia entre los comportamientos de la cepa atenuada XJ Cl₃ y las cepas virulentas.

Los intentos de aislamiento de los demás órganos estudiados fueron negativos. Por otro lado, aún cuando se demostró por inmunofluorescencia que un porcentaje variable de los animales presentaban antígenos virales en sus bazos (sección 4.1.5.3.), fue imposible rescatar virus de estos órganos.

Como se describió anteriormente para la etapa aguda de la infección (sección 4.1.4.1.1.) las viremias son clarificadas alrededor del día 30 p.i., coincidentemente con la detección de anticuerpos neutralizantes en títulos elevados. Los intentos de aislamiento de virus a partir de sangres de animales con más de 30 días de infección resultaron negativos en 19 de 20 cricétidos estudiados. El único animal que presentó viremia positiva, sugirió la posibilidad que existieran viremias fugaces, tal como sucede en otros sistemas virus-huésped e inclusive en C. musculinus infectado con cepas virulentas de virus Junín, y que en estos experimentos no hubieran sido detectadas por no haber practicado sangrados sucesivos.

Con la intención de comprobar este supuesto, se inocularon 20 C.mus-
culinus neonatos por vía i.p. De esta infección sobrevivieron 5 animales, los que fueron sangrados periódicamente después del día 30 p.i. Los sangrados se practicaron cada 7 días durante 2 meses.

Uno de los cricétidos estudiados presentó en dos oportunidades no consecutivas viremias positivas.

Estos resultados permitieron presumir la existencia de viremias fugaces como uno de las manifestaciones de la infección persistente, aunque su incidencia no estaría generalizada al total de los animales persistentes.

Esto fue corroborado por Alché y col (1), demostrando la existencia de viremias fugaces o persistentes, en un número significativo de *C. musculinus* sobrevivientes a la infección experimental con la cepa XJ Cl₃ (8 de 23 animales estudiados).

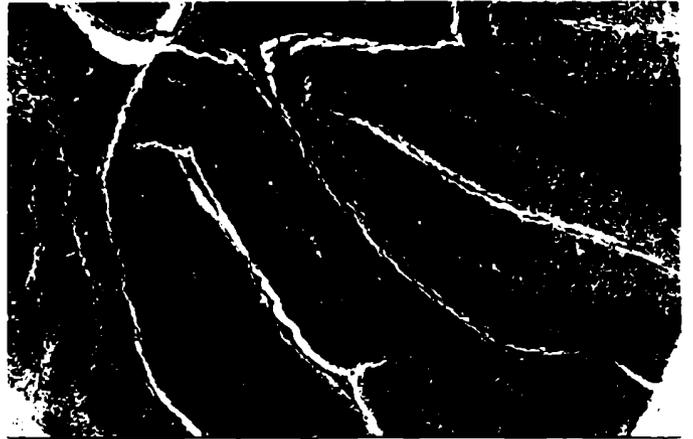
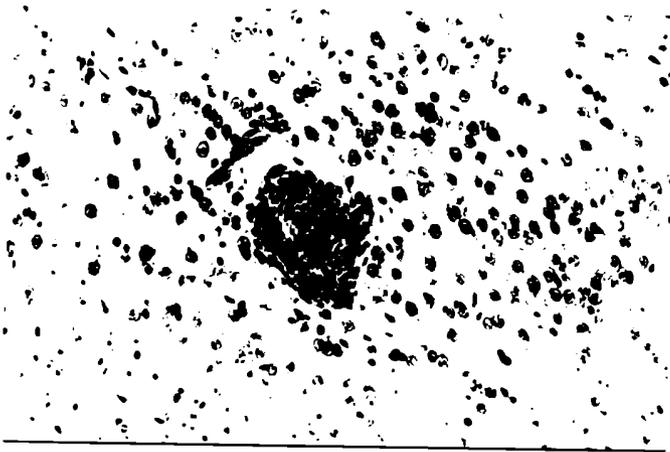
4.1.5.2. ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS

Los animales sobrevivientes a la infección perinatal e infectados persistentemente, presentaron alteraciones patológicas solamente en el cerebro. Se detectaron infiltrados mononucleares localizados alrededor de los vasos sanguíneos, o en forma difusa en la corteza cerebral (figura 10). Además, en algunos sectores se observaron focos de gliosis distribuidos en forma no selectiva e infiltración linfocitaria en leptomeninges (figura 11).

A nivel de cerebelo se observó el mismo tipo de lesiones inflamatorias y gliosis en sustancia blanca. Coincidentemente se observaron grados variables de atrofia cerebelosa evidenciada por una disminución en el espesor de la capa molecular con un aumento relativo del número de células (figuras 12a y 12b).

Las lesiones encefálicas se observaron en todos los animales con aislamiento positivo de virus en cerebro, siendo imposible hallar lesiones en los cricétidos que habían limpiado el virus del organismo.

FIGURA 10 - 12



10: Encefalitis con perivascularitis predominantemente linfocitaria (H&E x 250)

11: Leptomeningitis linfocitaria (H&E x 250)

12 A: Atrofia cerebelosa notable en la capa molecular (H&E x 50)

12 B: Corteza cerebelosa de un animal sin infectar, de la misma edad que el animal de la figura anterior (H&E x 250)

Los estudios anatomopatológicos realizados en el resto de los órganos, de animales crónicamente infectados o de animales que habían clarificado el virus de su organismo, demostraron como única alteración morfológica, daño renal. Estas lesiones no pudieron ser asociadas a una patología por virus Junín, sino a la elevada edad de los animales que presentaban dichas alteraciones (todos ellos superaban los 400 días de vida).

Con el objeto de corroborar este diagnóstico, se sacrificaron 6 animales sin infectar de aproximadamente 1 año de edad, y 2 de ellos presentaron el mismo tipo de daño renal.

4.1.5.3. DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOFLUORESCENCIA

El uso de la técnica de inmunofluorescencia permitió observar en todos los animales con lesiones en cerebro, una intensa fluorescencia en un gran número de neuronas corticales, y en los núcleos de la base granular, así como también, en pequeños vasos sanguíneos de la corteza.

El cerebelo mostró fluorescencia positiva intensa en la capa granulosa.

La inmunofluorescencia fue negativa en aquellos cerebros que no presentaban lesiones morfológicas.

Los estudios inmunohistoquímicos de glándulas salivales demostraron que el 25% de las muestras estudiadas tenía antígeno viral en el lumen del acino y en el citoplasma de las células secretorias.

Como se mencionó anteriormente, los intentos de aislamiento viral

a partir de bazos, arrojaron resultados negativos en el 100% de los casos; pero cuando este órgano fue estudiado por inmunofluorescencia se pudo determinar la presencia de antígeno viral en el 12% de las muestras (7/59), algunas de las cuales correspondían a animales con aislamiento e inmunofluorescencia negativa en cerebro. Estos resultados serán ampliados en la discusión.

Los restantes órganos estudiados fueron rutinariamente negativos.

4.1.5.4. ESTUDIOS SEROLOGICOS

El análisis de los sueros de los C.musculus que superaron los 30 días p.i. mediante la prueba de neutralización, indicó que todos los animales inoculados por vía i.p. hubieran enfermado o no, tenían altos títulos de anticuerpos. En estos estudios se incluyeron muestras de sueros de animales persistentemente infectados así como animales que eliminaron el virus del organismo.

Las muestras se tomaron entre los días 32 y 523 p.i., observando que la mayoría de los títulos de anticuerpos eran superiores a 320 para animales sacrificados antes de cumplir un año de inoculación, estuvieran o no persistentemente infectados, mientras que a tiempos mayores de sacrificio los títulos obtenidos para animales sanos eran un poco menores (20-160).

4.1.6. CONCLUSIONES PARCIALES

La correlación entre los estudios virológicos, morfológicos, inmunohistoquímicos y serológicos, indican que los animales responden de formas diferentes a la infección

En la tabla 5 se resumen, en base a un número elegido de animales, los tres grandes grupos en que podemos clasificar las respuestas del C. musculus a la infección i.p.

Los dos primeros grupos, que se diferencian en el grado de severidad de la enfermedad sufrida (con o sin sintomatología clínica evidente), muestran que las lesiones cerebrales aparecen solamente en animales persistentemente infectados, o sea, aquellos que presentan inmunofluorescencia y aislamiento viral positivos. Además la presencia de lesiones fue independiente de la existencia de anticuerpos neutralizantes. En el tercer grupo en cambio, en el que el virus ha sido eliminado del organismo, dado que los estudios virológicos e inmunohistoquímicos fueron negativos, no se observaron lesiones o alteraciones morfológicas, pero si una buena respuesta humoral con altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

Estos hallazgos indican que la presencia de virus en el cerebro, ya sea demostrable por aislamiento viral o inmunofluorescencia, es coincidente con la aparición de lesiones anatomopatológicas. En cambio, en animales que seguramente fueron infectados ya que presentaron anticuerpos anti-virus Junín, pero consiguieron eliminar el virus del organismo, no se observaron lesiones.

El perfil mostrado en la tabla 5 no incluye la persistencia viral en glándulas salivales, ya que no se ha presentado como un mecanismo general, sino como una alternativa con baja incidencia en los animales crónicamente infectados.

TABLA 5

SINTESIS DE LAS DIFERENTES RESPUESTAS OBSERVADAS EN C. musculus QUE SUPERABAN LA FASE AGUDA DE LA ENFERMEDAD CON VIRUS JUNIN

DIA p.i.	SINTOMAS DE ENFERMEDAD	AISLAMIENTO DE CEREBRO	LESION CEREBRAL	IF ^a EN CEREBRO	TITULO ANTICUERPOS NEUT.
63	+	+	ME ^b	+	>720
63	+	+	ME	+	>720
68	+	+	ME	+	>320
68	+	+	ME	+	>320
80	+	+	ME	+	>720
90	+	+	ME	+	>320
130	+	+	ME	+	>320
131	+	+	ME	+	>320
161	+	+	ME	+	>320
172	+	+	ME	+	>320
225	+	+	ME	+	>320
68	-	+	ME	+	>320
78	-	+	ME	+	>320
80	-	+	ME	+	80
88	-	+	ME	+	>1280
88	-	+	ME	+	nh ^d
94	-	+	ME	+	>320
220	-	+	ME	+	nh
343	-	+	ME	+	>320
343	-	+	ME	+	>320
48	-	-	S ^c	-	nh
80	-	-	S	-	20
124	-	-	S	-	>320
244	-	-	S	-	>320
244	-	-	S	-	>320
295	-	-	S	-	160

a: inmunofluorescencia; b:meningoencefalitis; c:sano; d: no hecho

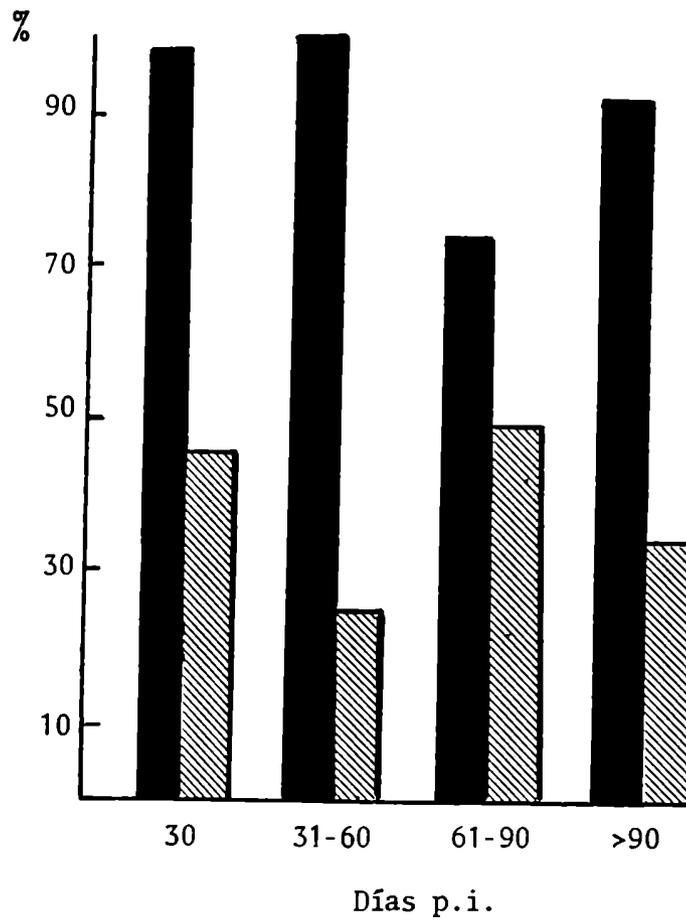
Como se describió anteriormente (sección 4.1.3.), los animales inoculados pueden presentarse sanos durante y después de la fase aguda de la infección, aún cuando los mismos vayan a cursar una infección persistente. Así mismo existe un segundo grupo de cricétidos que cursa la primera etapa de la infección con sintomatología clínica aguda, con posterior recuperación o presentando secuelas permanentes durante la infección crónica.

Con el objeto de establecer la influencia que tenían estos dos tipos de respuestas durante la infección aguda sobre el establecimiento o no de un estado de infección crónica, se analizaron los porcentajes de los cricétidos persistentemente infectados obtenidos de animales que en algún momento habían presentado signos de enfermedad o que nunca se mostraron enfermos.

Sobre un total de 189 animales estudiados, 129 estaban o habían estado enfermos y 60 nunca presentaron síntomas. Los animales fueron clasificados en cuatro grupos según el tiempo p.i. de sacrificio (0-30; 31-60; 61-90 y mayores de 90). Posteriormente se calcularon los porcentajes de aislamientos virales positivos en cada uno de los grupos. La figura 13 resume los resultados obtenidos. Las barras llenas corresponden a los aislamientos positivos de animales que presentaron enfermedad, observándose que la mayor parte de estos animales cursan una infección persistente y que solamente entre el 10 y el 20% de los mismos elimina el virus de su organismo. Las barras rayadas corresponden a los aislamientos positivos de animales asintomáticos, esta-

FIGURA 13

RELACION ENTRE EL CURSO DE LA FASE AGUDA DE LA INFECCION Y LOS PORCENTAJES DE C. musculus CRONICAMENTE INFECTADOS, OBTENIDOS POR INOCULACION DE VIRUS JUNIN POR VIA I.P.



- SINTOMAS CLINICOS POSITIVOS Y AISLAMIENTO VIRAL POSITIVO
- ▨ SINTOMAS CLINICOS NEGATIVOS Y AISLAMIENTO VIRAL POSITIVO

bleciendo que solamente entre el 50 y el 30% de los integrantes de este grupo cursan una infección crónica.

Los resultados sugieren que la mayoría de los animales que cursan con enfermedad y superan la fase aguda, van a establecer un estado de infección persistente, mientras que aproximadamente la mitad de los animales que no enferman se presentan crónicamente infectados y el resto elimina el virus.

Además, en los animales crónicamente infectados, el virus permanece en los cerebros en títulos más o menos constantes (como se mostró en la figura 9) y por otro lado, no existiría clarificación del virus en función del tiempo transcurrido, dado que los porcentajes obtenidos en la figura 13 para los distintos tiempos p.i. son sustancialmente comparables.

4.2. CARACTERISTICAS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DEL C. musculus ADULTO

4.2.1. SUSCEPTIBILIDAD DEL C. musculus ADULTO A LA INFECCION POR VIA INTRA-PERITONEAL E INTRANASAL

La alta patogenicidad y marcado neurotropismo de la cepa XJ Cl₃ dificultó en cierto modo los experimentos destinados a establecer persistencia viral utilizando animales recién nacidos, ya que la obtención de un número importante de animales crónicamente infectados se realizó frente a un alto costo de muertes (siempre superior al 70 %).

Por otra parte no fue posible infectar animales mayores de 21 días por vía i.p.; todos los intentos por demostrar la presencia de virus Junín en estos animales fueron negativos aún cuando desarrollaron niveles importantes de anticuerpos neutralizantes.

Ante estas circunstancias, la aparición de síntomas de encefalitis en una madre que amantaba crías inoculadas y los antecedentes de infecciones experimentales realizados por Sabbatini y col (76), llevaron a considerar tanto la vía oral como la respiratoria para la infección experimental del C. musculus adulto, imitando la vía natural que ocurriría entre animales en íntimo contacto.

Con este objeto se realizó un estudio preliminar sobre la respuesta del Calomys a la infección por vía i.n. A diferencia de la resistencia observada en animales adultos a la infección por vía i.p., la inoculación por vía i.n. causó una enfermedad con sintomatología neurológica similar a la presentada por los Calomys neonatos. Además se observó que los animales menores de 60 días enfermaban y morían en mayor proporción que los cricétidos de mayor edad.

Con el objeto de determinar la susceptibilidad a la infección por vía i.n. y tomando como base los resultados antes mencionados, se realizó un estudio sobre dos grupos de animales de diferentes edades (30-60 y 90-150 días de vida). La inoculación se practicó ins-tilando en la cavidad nasal 100.000 DL₅₀ de virus Junín contenidas en 0,05 ml de medio de cultivo. Los animales fueron examinados diariamente durante un año, registrándose signos de enfermedad o muerte. Los resultados se resumen en la tabla 6.

TABLA 6

SUSCEPTIBILIDAD DEL C. musculus ADULTO A LA INFECCION CON VIRUS JUNIN POR VIA i.n.

EDAD	N° DE ANIMALES INOCULADOS	DOSIS (DL ₅₀)	ENFERMEDAD		MUERTE	
			N° ANIM.	%	N° ANIM.	%
30-60	45	10 ⁵	21	46,7	19	42,2
90-150	45	10 ⁵	17	37,7	15	33,3

El análisis porcentual de la tabla 6 confirma los resultados obtenidos en el estudio preliminar. La incidencia de la enfermedad, así

como de la mortalidad, decreció con el aumento de la edad de los cricétidos, siendo la diferencia del 10% para los dos parámetros registrados.

Por otro lado, los porcentajes de morbimortalidad obtenidos con esta vía para cualquiera de los dos grupos de animales, son sensiblemente inferiores a los porcentajes registrados con la vía i.p. en cricétidos neonatos.

4.2.2. SUSCEPTIBILIDAD DEL C. musculus ADULTO A LA INFECCION CON VIRUS JUNIN POR VIA i.n.: INFLUENCIA DE LA DOSIS INOCULADA

El procedimiento experimental utilizado para realizar la inoculación por vía i.n. consistió en instilar gota a gota en la cavidad nasal los 0,05 ml de medio de cultivo que contenían la dosis elegida. Este método presenta el inconveniente de no asegurar que el volumen inoculado sea efectivamente absorbido por el animal, dado que el cricétido al respirar provoca aerosoles que eliminan parte del material instilado, lo cual hace imposible conocer la dosis exacta que recibe el animal.

En consecuencia se decidió estudiar la influencia de la dosis sobre la respuesta del Calomys a la infección, con el objeto de establecer si se modificaban los porcentajes obtenidos en la tabla 6, o si por el contrario como sucedió para la vía i.p., variaciones en la dosis no se reflejaban en la respuesta al virus.

El estudio se realizó sobre el esquema experimental de la sección 4.2.1, modificando solamente el número de animales utilizados para cada grupo (30-60: 18 animales y 90-150: 15 animales) y la dosis que en este caso fue de 10.000 DL₅₀ en 0,05 ml de medio de cultivo.

En la figura 14 se ha graficado en forma comparativa las respuestas obtenidas para ambas dosis en los distintos grupos de animales. La barras rayadas representan los porcentajes de animales enfermos y las barras blancas los porcentajes de animales muertos. En la parte superior de cada grupo de barras figura la dosis utilizada y en la parte inferior se indica la edad de los animales .

Los porcentajes obtenidos para los dos parametros registrados (enfermedad y muerte), fueron sensiblemente menores cuando la dosis utilizada fue 10.000 DL₅₀, tanto para el grupo de 30-60 días como para el grupo de mayor edad.

Las diferencias observadas se tradujeron más tarde en un mayor número de animales persistentemente infectados en favor de la dosis más alta, por lo cual se decidió continuar los experimentos con dicha dosis.

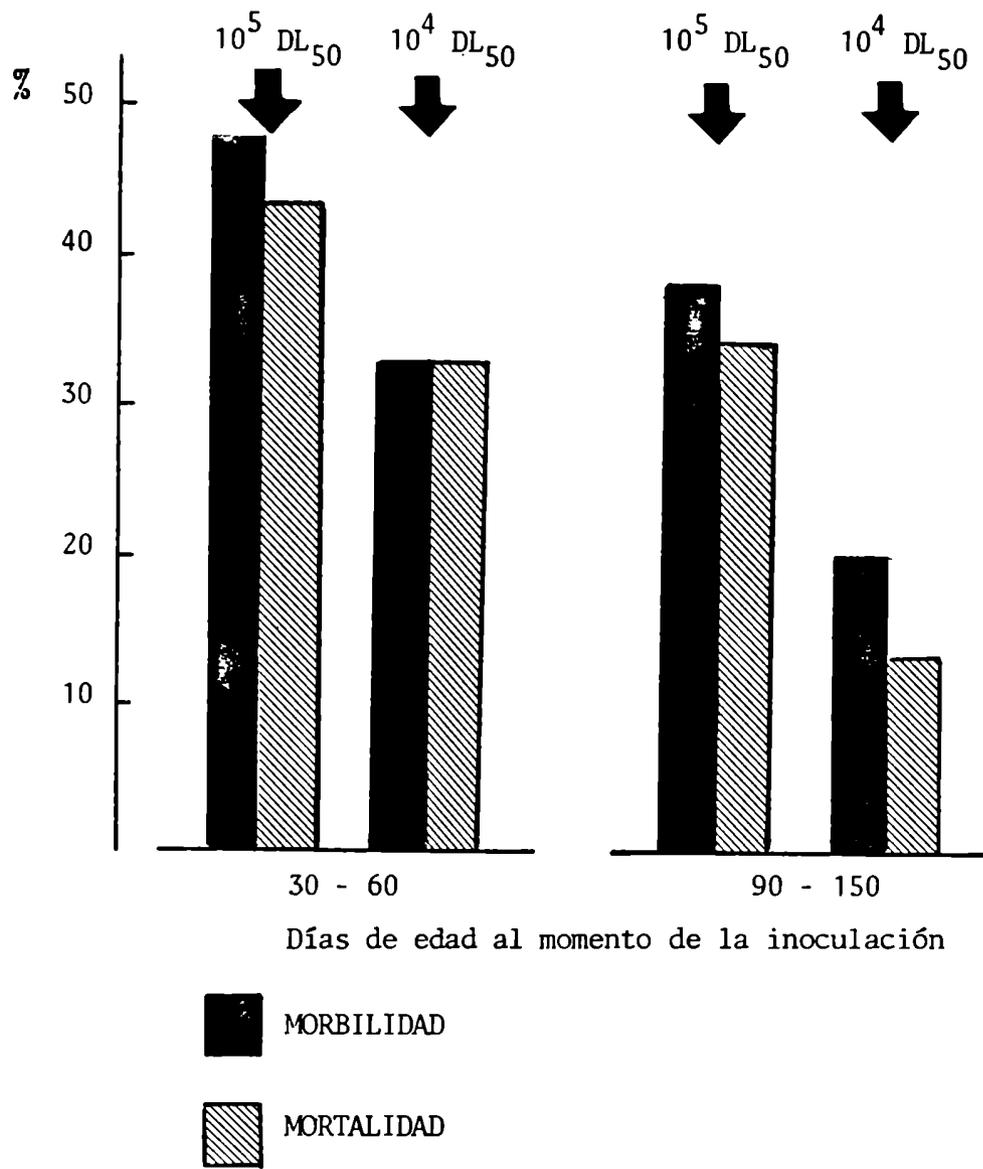
Por otro lado, las diferencias en los porcentajes de morbilidad observadas para las distintas dosis se deberían a que la cantidad efectiva de virus absorbida durante el proceso de instilación sería mucho menor que la calculada teóricamente, y además a que gran parte del volumen absorbido podría ser derivado al tracto gastrointestinal, que posiblemente sea una vía de infección menos eficiente.

Como conclusión se puede decir que la mayor eficiencia de infección por vía i.n. se lograría trabajando con la dosis más alta contenida en el menor volumen posible.

Por otra parte, se pensó que si se trabajaba con stocks de virus

FIGURA 14

GRAFICO COMPARATIVO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCION DEL *Calomys musculinus* INOCULADO POR VIA I.N. CON DISTINTAS DOSIS DE VIRUS JUNIN



que tuvieran menor cantidad de contaminantes proteicos y lipídicos que los stocks obtenidos de cerebro de ratón blanco y respetando las condiciones recién enunciadas, se lograría mejorar la eficiencia del proceso.

Con este objeto se inocularon animales con 0,05 ml de medio de cultivo conteniendo 100.000 DL_{50} de un stock de virus Junín preparado en células Vero.

Los resultados de esta inoculación fueron semejantes a los obtenidos con el stock de cerebro de ratón blanco, demostrando que el material acompañante en la suspensión de virus no interfiere en la adsorción del virus a las células del tracto respiratorio.

4.2.3. DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD

Los síntomas clínicos de la enfermedad fueron similares a los desarrollados por los animales neonatos infectados por vía i.p..

Las primeras manifestaciones se registraron a partir del día 20 p.i., con cuadros de lateralización de la marcha y pérdida del equilibrio.

Los síntomas neurológicos tuvieron dos máximos de incidencia, uno alrededor del día 25 p.i. y otro el día 40 p.i..

Una diferencia observada en relación con los resultados de Calomys neonatos inoculados por vía i.p., fue que el porcentaje de animales que se recuperó de la enfermedad fue muy bajo, menor al 10%, si bien los porcentajes de morbimortalidad fueron menores para los animales adultos.

Las muertes se produjeron generalmente entre el 2do y 4to día de la aparición de los síntomas neurológicos, aunque se han registrado algunos casos en que los animales sobrevivieron con síntomas evidentes de enfermedad por más de tres meses.

4.2.4. PATOGENESIS DE LA INFECCION

La infección por vía i.n. a diferencia con la vía i.p., no presentó diferencias clínicas tan evidentes, que permitieran dividirla temporalmente en fase aguda y persistente. La aparición de síntomas de enfermedad estuvo restringida a un pequeño período de tiempo, por lo que la etapa aguda en algunos animales fue coincidente con la persistente en otros.

Las características virológicas, morfológicas, inmunohistoquímicas, y serológicas de esta infección se determinaron sobre un grupo de 26 animales inoculados con 100.000 DL₅₀ por vía i.n.. A distintos tiempos p.i. (1, 4, 7, 11, 15, 20, 25, 27, 29, 32, 48, 112, y 326 días p.i.), dos animales infectados y un control sano se sacrificaron para estos estudios.

Se realizaron algunos estudios virológicos complementarios sobre algunos animales infectados para los estudios de morbimortalidad de las secciones 4.2.1. y 4.2.2..

4.2.4.1. ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS

Los estudios morfológicos mostraron a partir del día 7 p.i. una marcada meningoencefalitis, caracterizada por infiltrados mononucleares entre las neuronas y alrededor de los vasos sanguíneos, con ocasionales áreas de necrosis de la sustancia gris o blanca.

En los estudios de los demás órganos no se observaron alteraciones morfológicas.

La correlación de estos datos con los resultados de los demás estudios realizados se muestran en la tabla 7, y se analizan en la sección 4.2.5.

4.2.4.2. DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOFLUORESCENCIA

Los estudios de inmunofluorescencia mostraron determinantes antigénicos de virus Junín en el citoplasma neuronal y en los vasos sanguíneos del cerebro.

Los estudios de los restantes órganos fueron rutinariamente negativos.

Dado que en la infección por vía i.p. se había determinado por inmunofluorescencia la presencia de antígenos virales en bazo, se decidió ampliar el estudio inmunohistoquímico a los bazos de los animales sobrevivientes del estudio de morbilidad. Sobre 27 muestras estudiadas solamente se encontró un bazo positivo, lo que significó una incidencia menor del 3 %.

4.2.4.3. AISLAMIENTOS DE VIRUS

Los intentos de recuperar virus a partir de órganos de Calomys infectados por vía i.n., solamente tuvieron éxito cuando se ensayaron en cerebro.

Los títulos virales obtenidos fueron menores que los alcanzados en la infección por vía i.p. La diferencia observada fue entre uno y dos logaritmos, obteniéndose valores entre 10^3 y 10^4 DL₅₀ / ml. Los datos

obtenidos se resumen en la tabla 7.

Los resultados indican que las lesiones en cerebro son coincidentes con la presencia de virus infeccioso, pudiendo aislar virus a partir del día 4to y hasta el día 326 p.i. en que se tomó la última muestra.

Los intentos de aislar virus a partir de sangre generalmente no tuvieron éxito y los pocos aislamientos positivos se lograron a partir del día 25 p.i. y hasta el 38 p.i..

Así mismo los aislamientos virales de glándulas salivales fueron negativos en 16 muestras de 17 analizadas.

4.2.4.4. SEROLOGIA

La infección de los animales adultos por vía i.n. fue siempre exitosa, dado que después del día 11 p.i. todos los cricétidos presentaron anticuerpos neutralizantes específicos en sus sueros, a pesar que solamente el 30% de los casos estudiados presentaron virus en cerebro.

4.2.5 CONCLUSIONES PARCIALES

Los datos presentados sugieren que la inoculación de adultos por vía i.n. puede conducir a un estado de infección persistente, de acuerdo con los datos obtenidos de los animales sacrificados a los 112 y 326 días p.i. (tabla 7).

Con el objeto de ampliar estos resultados se infectaron por vía i.n. 13 animales mayores de 60 días de edad, que fueron sacrificados en su totalidad a los 70 días p.i.

TABLA 7

CORRELACION DE LOS ESTUDIOS VIROLOGICOS, MORFOLOGICOS, INMUNOHISTOQUIMICOS
Y SEROLOGICOS DE C. musculus ADULTOS INFECTADOS CON VIRUS JUNIN POR VIA I.N.

DIA p.i.	TITULO DE VIRUS EN CEREBRO*		IF° EN CEREBRO		LESION CEREBRAL		TITULO ANTICUERPOS NEUTR.	
	1	<1,7	<1,7	-	-	-	-	<5
4	1,0x10 ²	1,0x10 ²	+	+	-	-	<5	nh
7	<1,7	1,0x10 ²	-	+	-	+	nh	<5
11	8,0x10 ²	2,0x10 ²	+	+	+	-	40	<5
15	8,0x10 ²	2,0x10 ²	+	+	+	+	>320	nh
20	2,0x10 ⁴	2,0x10 ³	+	+	+	+	nh	nh
22	2,1x10 ²	nh	+	nh	+	nh	>320	nh
25	<1,7	<1,7	-	-	-	-	40	nh
27	<1,7	2,0x10 ⁴	-	+	-	+	>320	80
29	<1,7	1,0x10 ³	-	+	-	+	80	>320
32	<1,7	<1,7	-	-	-	-	>320	>320
48	<1,7	<1,7	-	-	-	-	>320	>320
112	<1,7	nh	-	nh	-	nh	>320	nh
326	1,0x10 ⁴	nh	+	nh	+	nh	>320	nh

*:expresado en DL₅₀/ml; °:immunofluorescencia; nh:muestra no estudiada

En cinco de estos animales se detectó virus en cerebro, en títulos de 10^2 a 10^4 DL_{50}/ml , coincidentemente con la observación de meningoencefalitis.

Estos resultados confirman que la infección del C. musculinus adulto por vía i.n. induce una infección persistente.

El resto de los cricétidos inoculados clarificó el virus, pero al igual que los animales persistentemente infectados, desarrollaron anticuerpos neutralizantes en títulos mayores a 320.

Los estudios de susceptibilidad del Calomys musculinus adulto a la infección con virus Junín por vía i.n. determinaron que al aumentar la edad del cricétido al momento de la infección se obtenían menores índices de morbimortalidad (tabla 6). Así mismo cuando la variable fue la cantidad de virus inoculada se observó que si se disminuía 10 veces la dosis, los porcentajes de enfermedad y muerte lo hacían entre un 15 y un 20 % respecto de la dosis más alta (figura 14).

Con el objeto de determinar la importancia de estas dos variables sobre la respuesta de tipo persistente, se analizaron en la tabla 8 los casos de persistencia viral en función de la edad al momento de la infección, así como, de la dosis inoculada.

Si se observa la primera y tercer fila de la tabla, se puede concluir que la edad al momento de la infección no tiene ninguna influencia sobre el tipo de respuesta, dado que los porcentajes de animales persistentemente infectados son prácticamente iguales, aún cuando las incidencias de morbimortalidad entre ambos grupos son diferentes.

Si ahora se comparan las dos primeras filas y las dos últimas, se puede observar una marcada tendencia en favor de la respuesta persistente para la dosis mayor. Aunque se debe destacar que estos resultados no tienen un valor definitivo dada la diferente cantidad de animales que se utilizaron para una y otra dosis. Esto se debió a que se disponía de mayor cantidad de cricétidos inoculados con la dosis más alta, ya que los estudios sobre la vía i.n. se plantearon bajo esas condiciones, como fuera fundamentado en la sección 4.2.2.; mientras que los animales inoculados con la dosis menor, eran los provenientes de uno de los estudios preliminares.

TABLA 8

INFLUENCIA DE LA DOSIS DE VIRUS JUNIN Y DE LA EDAD DEL C.musculus
INOCULADO POR VIA I.N. SOBRE EL TIPO DE RESPUESTA A LA INFECCION

EDAD AL MOMENTO DE LA INFECCION*	DOSIS#	N° ANIMALES ESTUDIADOS	AISLAMIENTO VIRAL**	
			POSITIVO	NEGATIVO
30 - 60	10 ⁵	31	10 (32%)	21 (68%)
	10 ⁴	5	0 (0%)	5 (100%)
90 - 150	10 ⁵	55	17 (31%)	38 (69%)
	10 ⁴	9	1 (11%)	8 (89%)

*: expresada en días; #: expresada en DL₅₀/ml; **: realizados en animales que superaban los 60 días p.i.

4.3. POSIBLES MECANISMOS DE TRANSMISION DEL VIRUS JUNIN

Como ya fuera mencionado en la introducción, los arenavirus se perpetúan en la naturaleza a través de la persistencia en sus huéspedes naturales, ya sea por transmisión vertical u horizontal.

En el binomio C. musculinus-virus Junín, se ha demostrado que hembras preñadas, virémicas al momento del parto, dan a luz crías libres de virus Junín. (76)

Estos experimentos fueron realizados sacrificando a distintos tiempos post-parto, las crías de Calomys madres que se presentaban infectadas al momento del parto. Si las crías eran testeadas entre el 4to y 20vo día post-parto, no se encontraban vestigios virales; mientras que si las crías eran estudiadas más tarde, entre 24 y 52 días, las crías que estaban en contacto con sus madres se presentaban infectadas. Los estudios virológicos realizados sobre estas madres indicaron eliminación de virus en saliva y en orina. La leche materna no fue estudiada. (76)

Además en ese mismo trabajo, fue estudiada la transmisión horizontal demostrando su existencia en animales en íntimo contacto, aunque el contagio por vía aérea, orina, heces o por contacto a través de telas metálicas también ocurrió pero en menor grado.

Los estudios realizados en el presente trabajo no pudieron demostrar eliminación de virus por orina y solamente se eliminarían pequeñas cantidades de virus por saliva, aunque en un porcentaje muy bajo de la población infectada persistentemente.

La escasa eliminación de virus dificultaba el estudio de las posibles vías de transmisión del agente en el huésped. Pero el control diario de los cricétidos inoculados para los distintos estudios, permitió determinar signos neurológicos en madres que amantaban crías infectadas por vía i.p.. Estas observaciones llevaron a realizar un estudio más profundo en hembras así infectadas.

Con este objeto, se estudiaron 7 C.musculus hembras que amantaban sus crías inoculadas experimentalmente. Estos animales fueron sacrificados a distintos tiempos post-parto y se practicaron aislamientos virales a partir de cerebros.

Los resultados se muestran en la tabla 9, y se observa que 3 de las 7 muestras estudiadas presentaron aislamiento positivo.

Se consideró la posibilidad de que la ingestión de restos de cadáveres de crías muertas por el virus pudiera ser la causa de la infección. Sin embargo, no pudo correlacionarse los aislamientos positivos con madres que hubieran practicado canibalismo.

Estas observaciones llevaron a diseñar dos experimentos destinados a comprobar el modo de transmisión del virus. (secciones 4.3.1 y 4.3.2)

4.3.1. INFECCION DE C.musculus ADULTO POR CONTACTO CON CRIAS INFECTADAS

El objetivo de este experimento era estudiar la infección crónica en C.musculus infectados por vías naturales, y sus diferencias con la infección experimental.

Basándose en los resultados detallados en la tabla 9, se decidió estudiar hembras adultas que amantaban crías inoculadas experimentalmente.

TABLA 9

DETECCION DE INFECCION NATURAL EN C. musculus MADRES DE CRICETIDOS
INOCULADOS CON VIRUS JUNIN

MADRE N°	TIEMPO SACRIFICIO POST-PARTO*	SINTOMAS DE INFECCION	CANIBALISMO	AISLAMIENTO DE VIRUS
1	31	no	si	+
2	37	no	si	-
3	48	no	si	-
4	51	no	no	-
5	60	si	no	+
6	62	no	no	-
7	97	no	no	+

*:expresado en días

Con este fin se tomaron 52 camadas de crías de C. musculus con sus respectivas madres. Las crías fueron inoculadas con 4000 DL₅₀ por vía i.p. Los animales fueron observados durante 23 días, registrándose diariamente síntomas de enfermedad o muerte. Luego de este período de observación las crías fueron destetadas y utilizadas para los diferentes experimentos de la sección 4.1.

Las madres fueron colocadas en jaulas individuales y a distintos tiempos grupos de por lo menos tres animales fueron sacrificadas por exanguinación por punción del plexo venoso retroorbitario. En cada grupo se practicó una autopsia detallada, obteniéndose muestras de cerebro, glándulas salivales, bazo, riñon, mama y ovario, los que fueron procesados para estudios anatomopatológicos, virológicos, inmunohistoquímicos y serológicos.

Los tiempos de sacrificios fueron entre 30 y 481 días post-contacto(p.c.), tomando como tiempo cero el día de inoculación de las crías.

Los resultados de este experimento se reseñarán juntamente con los del experimento de la sección 4.3.2.

4.3.2. TRANSMISION VERTICAL DEL VIRUS JUNIN EN C. musculus PERSISTENTEMENTE INFECTADOS

Este experimento se planteó de forma que C.musculus hembras preñadas estuvieran persistentemente infectadas en el momento de la parición, con el objeto de establecer si bajo estas condiciones las crías recién nacidas o en estado fetal estaban infectadas con virus Junín.

Este experimento planteaba un grado de incertidumbre debido a que

no se sabría cuales de las hembras preñadas estaban persistentemente infectadas hasta después del sacrificio de las mismas, o sea, cuando se pudiera practicar los aislamientos virológicos correspondientes. Esto era debido a que no se disponía de ningún método no traumático para investigar la presencia de virus en los animales, dado que la eliminación de virus por saliva o la existencia de viremias fugaces, que permitirían aislamientos virológicos no traumáticos, se presentaban en un bajo porcentaje de los animales crónicamente infectados.

En consecuencia, 8 *Calomys* madres sanas fueron expuestas al virus bajo las mismas condiciones del experimento anterior, luego del destete de las crías (23 días post-parto), fueron apareadas con machos sanos de aproximadamente la misma edad (entre 60 y 90 días de edad). Cuando se observaron signos inequívocos de preñez, 4 de las hembras fueron sacrificadas, dejando las restantes hasta 24 hs después del parto momento en que también fueron sacrificadas junto con sus crías.

En ambos casos los animales fueron sangrados a blanco y de todas las hembras se guardaron muestras de cerebro, glándulas salivales, bazo, ovario y placenta, las que fueron procesadas para estudios anatómopatológicos, inmunohistoquímicos, virológicos y serológicos. Estos mismos estudios fueron realizados en muestras de fetos o crías.

Los resultados de estos experimentos serán detallados a continuación juntamente con los de la sección 4.3.1.

4.3.3. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE LAS SECCIONES 4.3.1 y 4.3.2.

4.3.3.1. REGISTRO DE MORBIMORTALIDAD

Sobre 52 Calomys madres estudiadas, solamente 4 presentaron síntomas neurológicos y 3 de ellas murieron. La autopsia reveló presencia de antígenos de virus Junín en sus cerebros.

4.3.3.2. ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS

Los estudios anatomopatológicos demostraron alteraciones en cerebro y bazo solamente.

En los cerebros se observaron lesiones leves, consistentes en infiltrados mononucleares perivasculares y discretas meningitis. Como se puede ver en la tabla 10, estas alteraciones se presentaron en los animales sacrificados una semana después de practicado el destete, o sea 30 días p.c. y hasta los 481 días p.c. en que se tomó la última muestra.

El bazo por su parte mostró un notorio aumento de tamaño, llegando en algunos casos a duplicar el tamaño normal. Los estudios con microscopía de luz permitieron observar que las esplenomegalias, se debían a una marcada hiperplasia linfática a expensas de la proliferación de inmunoblastos en los centros germinativos de la pulpa blanca. Estas lesiones tuvieron menor incidencia que las detectadas en cerebro (tabla 10).

El resto de los órganos estudiados, así como, los fetos o crías recién nacidas no mostraron alteraciones morfológicas.

4.3.3.3. DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES POR INMUNOFLUORESCENCIA

La técnica de inmunofluorescencia permitió detectar antígenos de virus Junín en neuronas, vasos sanguíneos encefálicos y en escasas cé

TABLA 10

RESUMEN DE LOS ESTUDIOS MORFOLOGICOS E INMUNOHISTOQUIMICOS REALIZADOS EN MADRES DE CRIAS INOCULADAS CON VIRUS JUNIN POR VIA i.p.

TIEMPO DE SACRIFICIO*	DAÑO ENCEFALICO	ESPLENO-MEGALIA	IF# EN CEREBRO	IF EN BAZO	DAÑO O IF EN OVARIO
30- 59	2/ 6	2/11	2/ 6	2/11	0/11
60- 89	2/ 7	1/ 5	2/ 7	1/ 5	0/ 3
90-119	2/ 3	1/ 1	2/ 3	1/ 1	nh
120-149	2/19	3/19	2/19	3/19	0/15
150-210	2/ 6	3/ 6	2/ 6	3/ 6	0/ 2
481	2/ 5	2/ 5	2/ 5	2/ 5	nh
TOTAL	12/46	12/47	12/46	12/47	0/31

*: expresado en días post-inoculación de las crías que eran amamantadas por los animales sacrificados

#: inmunofluorescencia; nh: muestra no estudiada

lulas de bazo de aspecto estrellado.

La detección de inmunofluorescencia positiva en dichos órganos se vio correlacionada con la existencia de alteraciones morfológicas en los mismos (tabla 10).

El resto de los órganos estudiados no mostraron fluorescencia.

El estudio de los cortes de órganos de fetos o crías recién nacidas arrojó resultados negativos.

4.3.3.4. AISLAMIENTO DE VIRUS

Las muestras de cerebros de hembras que habían presentado lesiones e inmunofluorescencia positivas, fueron tituladas en ratón blanco. Estos intentos de aislamiento fueron en todos los casos exitosos y los títulos obtenidos oscilaron entre $2,4 \times 10^2$ y $4,8 \times 10^5$ DL₅₀/ml.

Los estudios virológicos realizados en sangre y otros órganos incluyendo los bazos que presentaron fluorescencia positiva fueron negativos. Así mismo los aislamientos a partir de órganos de fetos y crías recién nacidas fueron rutinariamente negativas.

4.3.3.5. SEROLOGIA

La pesquisa de anticuerpos neutralizantes permitió observar que alrededor del 70% de los animales presentaban títulos de anticuerpos variables desde 40 a 720.

4.3.4. CONCLUSIONES PARCIALES

En la tabla 11 se resumen algunos de los datos hallados en estos experimentos, pudiendo clasificarse las diferentes respuestas en cuatro grandes grupos.

Grupo 1: En este grupo se observa una estrecha correlación entre la presencia de lesiones histopatológicas y aislamiento de virus en encéfalo, de tal manera que aquellos animales que tenían meningitis y vasculitis, tenían determinantes antigénicos y virus infeccioso en encéfalo. Dentro de este grupo podemos diferenciar a su vez, entre aquellos cricétidos que además de tener sus cerebros infectados presentaron o no determinantes antigénicos en bazo: Grupo 1.1 y Grupo 1.2 . Además todos estos animales presentaron altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

Grupo 2: Este grupo, constituido por un menor número de animales, incluye a los cricétidos que presentaron exclusivamente determinantes antigénicos de virus Junín en bazo. Sin embargo, fue imposible recuperar virus infeccioso de alguno de estos órganos.

Al igual que los cricétidos del grupo 1 los animales de este grupo tenían altos niveles de anticuerpos neutralizantes.

Grupo 3: Incluye a aquellos animales que demostraron una respuesta inmune humoral contra el virus Junín, sin presentar ningún vestigio de virus o lesión en sus organismos.

Grupo 4: Este último grupo involucra a aquellos cricétidos que no tomaron contacto con el virus Junín, o si los hicieron no presentaban anticuerpos específicos o secuelas producidas por el virus Junín.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el contacto entre hembras sanas con animales inoculados experimentalmente puede llevar a un estado de infección persistente. Si bien se puede suponer que el contagio

TABLA 11

CORRELACION DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON HEMBRAS QUE AMAMANTABAN
CRÍAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

TIEMPO DE SACRIFICIO*	GRUPO	LESION EN CEREBRO	IMUNOFLOURESCENCIA EN CEREBRO	AISLAMIENTO VIRAL DE CEREBRO	LESION EN BAZO	IMUNOFLOURESCENCIA EN BAZO	AISLAMIENTO VIRAL DE BAZO	TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES
78	1.1	+	+	+	+	+	-	160
395	1.1	+	+	+	+	+	-	320
88	1.2	+	+	+	-	-	-	720
392	1.2	+	+	+	-	-	-	80
91	2	-	-	-	+	+	-	nh
236	2	-	-	-	+	+	-	320
120	3	-	-	-	-	-	-	80
109	4	-	-	-	-	-	-	<5

*: expresado en días post-inoculación de las crías que eran amamantadas por los animales sacrificados.

nh: muestra no estudiada.

de las hembras se produjo por vía respiratoria o por ingesta de materiales contaminados, se desconoce si las crías lactantes eliminan virus por alguna vía, dado que ha sido imposible determinarlo debido a las dificultades técnicas derivadas del pequeño tamaño de estos animales.

Las posibles vías de contaminación materna incluirían:

- .- contacto con virus eliminado por vías naturales (saliva, orina)
- .- ingestión de cadáveres de crías muertas por el virus
- .- absorción de parte del inóculo viral inyectado en las crías al limpiar con la lengua las crías recién inoculadas.

Este tipo de infección natural, provocaría una infección con menor morbimortalidad que la presentada por cualquiera de las tres vías descritas anteriormente, mientras que los estudios anatomopatológicos y virológicos demuestran patrones similares de infección, remarcándose una mayor incidencia de inmunofluorescencia positivas en bazo coincidentemente con la presencia de esplenomegalia.

Sin embargo, fue llamativo que no se pudiera aislar virus infeccioso de dichos órganos, por lo cual no se podría considerar el bazo como un órgano reservorio de virus.

Los estudios realizados en la sección 4.3.2., demostraron que sobre 8 madres apareadas, solamente 2 estaban persistentemente infectadas al momento de su sacrificio, o sea, durante la gestación o 24 hs después de producido el parto.

Ambas madres presentaron virus en cerebro y pertenecían al grupo de hembras que se sacrificaron 24 hs después del parto.

Los estudios realizados en crías recién nacidas demostraron que las mismas no estaban infectadas.

Por otro lado en la tabla 10 se muestran los resultados de los estudios de fluorescencia y microscopía de luz realizados en ovarios de 31 C. musculus madres, muchas de las cuales estaban crónicamente infectadas al momento del sacrificio, y en todos los casos se obtuvieron resultados negativos.

Las conclusiones de estos experimentos permiten presumir que si existe transmisión vertical, esta debe ocurrir algún tiempo después del nacimiento, posiblemente por contacto con secreciones maternas infectadas. Existiría un período refractario a la infección, durante la etapa lactante, dado que es muy probable que en la leche se transfieran anticuerpos contra el virus.

Esta posibilidad de protección pasiva de las crías durante el período lactante, se apoya en los estudios realizados por Sabattini y col (76), en los que solamente se lograba aislar virus de C. musculus neonatos que superaban dicho período.

4.4. FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL ESTABLECIMIENTO Y/O MANTENIMIENTO DE LA INFECCION PERSISTENTE DEL Calomys musculus CON VIRUS JUNIN

Fundamentalmente, se ha responsabilizado a la generación de mutantes virales termosensibles (ts), antigénicas u otras de menor virulencia, como posibles causas del establecimiento de infecciones persistentes, o alternativamente a la síntesis de partículas defectivas interferentes o interferón.

La mayoría de estas conclusiones se han obtenido en sistemas in-vitro , y posteriormente han sido homologadas a los sistemas in vivo aunque poco se ha hecho con estos últimos.

En relación con el virus Junín, se sabe que una de sus principales características es la de establecer persistencia tanto in-vivo como in-vitro. Dada su capacidad de infectar una amplia variedad de huéspedes experimentales (ratón, cobayo, hamster, rata y primates), con distintos grados de patogenicidad para cada uno de ellos, según la cepa de virus utilizada y la edad del animal en el momento de la infección, se han logrado importantes avances en el conocimiento de los tipos de infección y fisiopatología de la enfermedad, aunque es poco lo que se sabe acerca de los mecanismos utilizados por el virus para persistir en sus huéspedes.

Todos los conocimientos que se tienen acerca de estos mecanismos se deben a los trabajos in-vitro, en células Vero o BHK₂₁. Las características principales de los cultivos celulares persistentemente infectados son:

- Morfología y características citogenéticas similares a los de cultivos sanos. (13)
- Solamente entre el 0,1 y el 1 % de las células son productoras de virus. (13)
- La producción viral es cíclica durante los primeros estadios de la infección, posteriormente la producción de viriones es esporádica o nula. (7)

- Las partículas virales que se producen durante el período persistente, han mostrado modificaciones en termosensibilidad o termolabilidad. (13)

El aislamiento de mutantes ts implica la existencia de un fenómeno de selección natural en la población viral en favor de estas mutantes.

-Otras característica de los cultivos persistentemente infectados es la producción de partículas PI. (21,23)

Todo estos hallazgos permiten afirmar que la infección persistente es un fenómeno complejo en el que intervienen diversos factores, sin poder determinar los grados de importancia de cada uno de ellos. Por otro lado, el equilibrio de los factores intervinientes parecería estar regulado por factores celulares, dado que si se altera el estado fisiológico celular se producen modificaciones en dicho equilibrio. (8)

Si bien el análisis de los factores involucrados en la persistencia in vitro puede arrojar pautas sobre el mecanismo de la persistencia in vivo, aunque la complejidad de un organismo vivo y la presencia del sistema inmune complican la interpolación de los resultados.

Resulta entonces ideal, aunque complejo, establecer modelos experimentales in vivo que ayuden a comprender mejor la infección natural.

En un sistema virus-huésped se puede focalizar la investigación en el rol del huésped o en las modificaciones que sufre el parásito dentro

del mismo.

En esta sección se analizarán las alteraciones que sufre el virus durante la infección persistente, con el objeto de explicar o esclarecer el mecanismo de la persistencia.

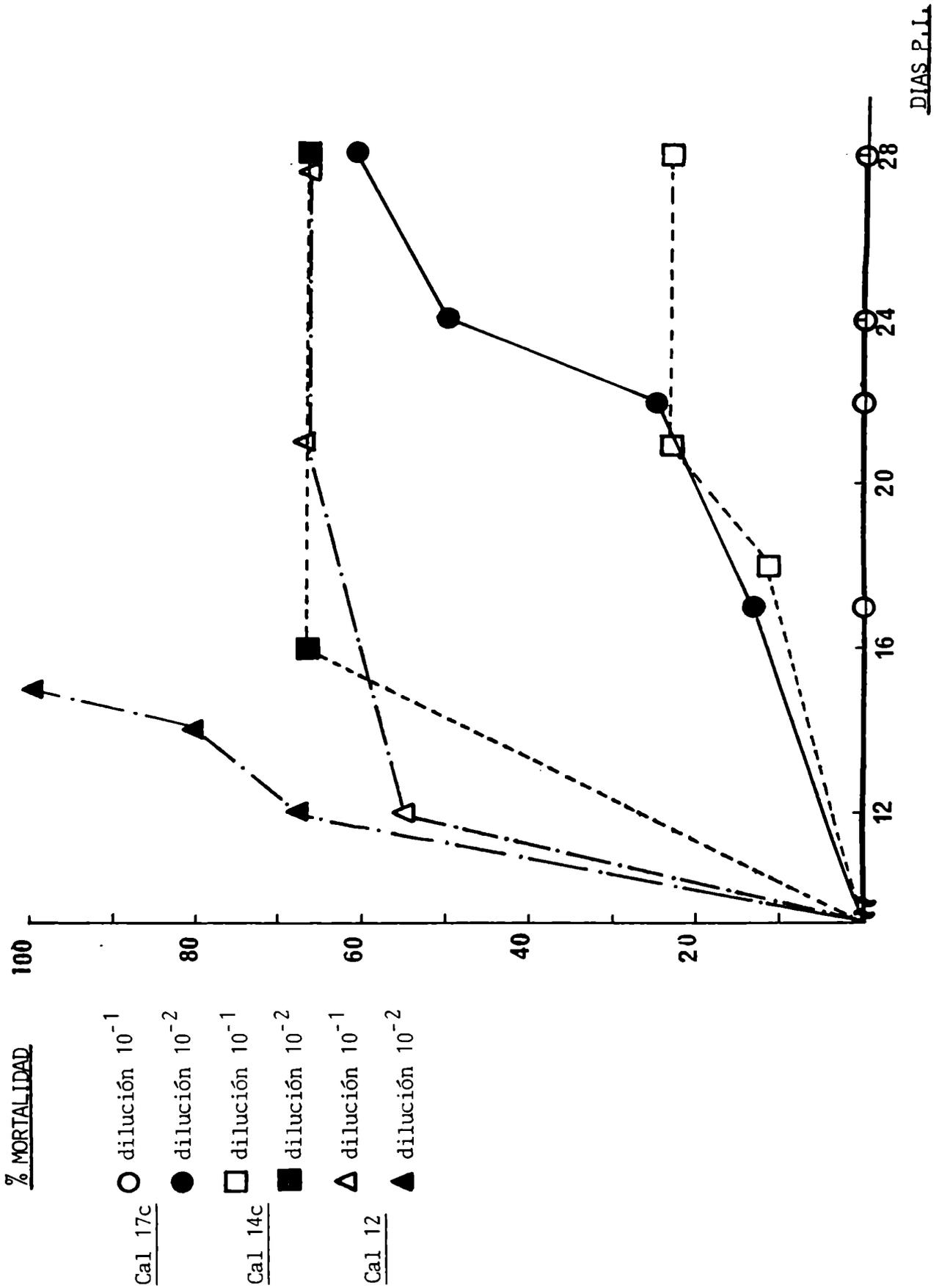
4.4.1. FENOMENO DE INTERFERENCIA EN LAS POBLACIONES VIRALES AISLADAS DE CEREBROS DE C. musculus CRONICAMENTE INFECTADOS

Como se mencionó anteriormente, los aislamientos virales se realizaron inoculando macerados al 10% (p/v) de los órganos a estudiar, por vía i.c. en ratón lactante. Cuando se efectuaban las titulaciones de materiales provenientes de cerebros que habían presentado aislamiento positivo, se observó que no siempre había una relación lineal dosis - respuesta.

Este fenómeno se puede observar en la figura 15, donde se han graficado los porcentajes de mortalidad acumulativos de los ratones inoculados con las distintas diluciones de las muestras a titular, en función del tiempo p.i.. En todos los casos graficados la mortalidad fue mucho mayor para las diluciones 1:100 que la presentada por las diluciones 1:10. Este comportamiento fue muy marcado en la muestra 17C, para la cual se obtuvo más de un 60 % de mortalidad en la dilución 1:100, mientras que el dilución menor no se registró mortalidad.

Simultáneamente se registraron otros resultados llamativos, como era la ausencia de placas en cultivos infectados con muestras de cerebros que habían presentado aislamiento positivo en ratón.

FIGURA 15 INTERFERENCIA DEL VIRUS AISLADO DE CEREBRO DE *Calomys musculus* Y TITULADO EN RATON BLANCO



Como ejemplo se puede citar la muestra 17C, cuyo título viral si bien no pudo ser calculado por el método de Reed y Muench por los problemas mencionados en el párrafo anterior, se puede suponer que estaría alrededor de 10^4 DL₅₀/ml. Pero cuando se intentó calcularlo en cultivo de tejidos por el método de unidades formadoras de placas, no se obtuvieron placas en ninguna de las diluciones ensayadas.

Este fenómeno se repitió en un número importante de muestras, y sus características eran similares a las descritas para otros sistemas virales, y que se denomina autointerferencia.

El fenómeno de autointerferencia ha sido asociado a la presencia de partículas PI en las poblaciones virales.

Con el objeto de comprobar si efectivamente los resultados obtenidos eran debidos a la presencia de partículas PI, se realizaron ensayos de interferencia viral con algunas de las muestras de cerebro en cuestión. Los materiales seleccionados correspondieron a los animales 17C y 29. Siguiendo el procedimiento detallado en materiales y métodos se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 12.

Como se puede observar, los materiales escogidos no produjeron placas per se, mientras que en las monocapas pretratadas con estos materiales y luego superinfectadas con virus estándar, se observó una disminución en el número de placas respecto de las obtenidas en el control de virus sin pretratamiento. La muestra correspondiente al Calomys 17C produjo un 52 % de inhibición, mientras que el material del Calomys 29 causo inhibición total en la producción de placas.

TABLA 12

ENSAYOS DE INTERFERENCIA CON POBLACIONES VIRALES OBTENIDAS DE CEREBROS DE
Calomys musculus

	MATERIAL INOCULADO	N° DE PLACAS*	% DE INHIBICION
Control de virus	virus estándar** + medio de cultivo	60	0
<u>Calomys 17C</u>	cerebro Cal. 17C# + medio de cultivo	0	--
	cerebro Cal. 17C# + virus estándar	29	52
<u>Calomys 29</u>	cerebro Cal. 29# + medio de cultivo	0	--
	cerebro Cal. 29# + virus estándar	0	100

*: El número de placas es el promedio de dos experiencias.

** : El stock de virus Junín estándar fue obtenido en células Vero, con un título de 3×10^6 UFP/ml y se utilizó en dilución 1:10.000.

: Los materiales de Calomys fueron utilizados en dilución 1:10

Este experimento permitió establecer formalmente la existencia de un fenómeno de interferencia, pero no aportó datos acerca de los factores que mediaban dicho fenómeno.

Los antecedentes de infecciones persistentes con virus Junín in vitro sugerían como posible causa de la interferencia a las partículas PI, pero no se podía descartar que estuviera mediado por otro tipo de partícula viral, como por ejemplo variantes de crecimiento lento o debido a la presencia de algún virus adventicio en el cerebro del Calomys.

En consecuencia, se buscó alguna metodología selectiva que permitiera discernir entre estas posibilidades. Dado que se sabía que las partículas PI de virus Junín son resistentes a la irradiación con luz UV (22), mientras que las variantes de crecimiento lento así como los virus adventicios posiblemente necesitarían su genoma intacto para ejercer su acción interferente, se decidió realizar un experimento similar al anterior, pero irradiando con luz UV previamente los materiales a ensayar. Este procedimiento eliminaría las dos últimas alternativas.

Por otra parte, los elevados porcentajes de interferencia que presentaban algunas de las muestras ensayadas, por ejemplo la muestra del Calomys 29, llevó a pensar que el fenómeno de interferencia era demasiado importante para ser causado solamente por partículas PI. En consecuencia se decidió realizar un control con cerebro normal, con el objeto de descartar algún factor inespecífico.

Para la realización del experimento se eligieron 5 muestras de cerebro que presentaban fenómeno de autointerferencia (Calomys 22, 29, 30, 33 y 41). De cada material se tomaron dos alícuotas, una de las cua-

les se irradiado durante 6 min. Posteriormente, se realizó un ensayo de interferencia con ambas alícuotas, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.13.

Los resultados se resumen en la tabla 13, donde se puede observar que todas las muestras de cerebro ensayadas, inclusive la proveniente de C.musculus normal, estuvieran o no irradiadas, inhibieron aproximadamente el 100 % de las placas del virus estándar.

En consecuencia estos resultados no permitieron concluir nada acerca de las partículas PI, pero apoyaron la presunción de la existencia de otro factor interferente; dado que el cerebro normal inhibió en la misma proporción que el resto de los materiales y solamente se podría descartar que la interferencia fuera debida a la replicación activa de algún agente viral.

La existencia de un factor(es) interferentes en los cerebros de los C.musculus normales, complicaba los intentos de establecer la presencia de partículas PI en las poblaciones virales del cerebro y su posible papel en la persistencia.

En vista de estos resultados se pensó que sería posible demostrar la presencia de partículas PI, utilizando dos estrategias diferentes:

- .- Diferenciar las actividades interferentes por sus mecanismos de acción.
- .- Separando físicamente las actividades interferentes.

Se sabía que las partículas PI ejercen su acción dentro de la célula. Por otra parte, los estudios realizados con otros factores inter-

TABLA 13

ACTIVIDAD INTERFERENTE DE CEREBROS DE C. musculus INFECTADOS SOBRE LA MULTIPLICACION DEL VIRUS JUNIN

	MATERIAL INOCULADO#	N° DE PLACAS*	% DE INHIBICION
Control de virus	virus estándar + medio de cultivo	58,3	0
Cerebro normal	cerebro normal + medio de cultivo	0,0	--
	cerebro normal + virus estándar	6,5	89
	cerebro normal irradiad.+ virus estándar	15,0	74
<u>Cerebro Calomys 29</u>	cerebro Cal 29 + medio de cultivo	0,0	--
	cerebro Cal 29 + virus estándar	0,0	100
	cerebro Cal 29 irradiad.+ virus estándar	0,0	100
<u>Cerebro Calomys 30</u>	cerebro Cal 30 + medio de cultivo	0,0	--
	cerebro Cal 30 + virus estándar	4,5	92
	cerebro Cal 30 irradiad.+ virus estándar	3,0	95
<u>Cerebro Calomys 33</u>	cerebro Cal 33 + medio de cultivo	0,0	--
	cerebro Cal 33 + virus estándar	0,0	100
	cerebro Cal 33 irradiad.+ virus estándar	0,0	100

continúa...///

...///

TABLA 13 (continuación)

	MATERIAL INOCULADO#	N° DE PLACAS*	% DE INHIBICION
Cerebro <u>Calomys</u> 22	cerebro Cal 22 + medio de cultivo	0,0	--
	cerebro Cal 22 + virus estándar	5,5	91
	cerebro Cal 22 irradiad.+ virus estándar	6,5	89
Cerebro <u>Calomys</u> 41	cerebro Cal 41 + medio de cultivo	0,0	--
	cerebro Cal 41 + virus estándar	0,0	100
	cerebro Cal 41 irradiad.+ virus estándar	0,0	100

#: Las muestras de cerebros se utilizaron en dilución 1:10. El stock de virus Junín estándar fue obtenido en células Vero, con un título de 3×10^6 UFP/ ml y se utilizó en dilución 1:10.000.

*: Cada una de las muestras se ensayó por duplicado y el número de placas es el promedio de ambas experiencias.

ferentes de origen celular, hacían suponer que la actividad antiviral estuviera mediada por un bloqueo de los receptores celulares, impidiendo la adsorción y en consecuencia la entrada del virus estándar.

En función de este supuesto y sabiendo que las partículas PI al igual que las partículas salvajes, se adsorben irreversiblemente luego de un período de tiempo, se podía suponer que si se dejaban adsorber suspensiones de cerebros infectados (que tendrían partículas PI y el factor celular) durante una hora, y luego se lavaba la monocapa se lograría eliminar el factor interferente celular, cuando ya las partículas PI estuvieran adsorbidas, pudiendo de esta forma realizar ensayos de interferencia específicos para partículas PI.

En consecuencia, se debía establecer en primer lugar si diluyendo las suspensiones de cerebro se eliminaba el factor celular, o si luego de adsorber dichas suspensiones a monocapas celulares se podía remover el factor con lavados sucesivos.

Con este objeto, distintas diluciones de una suspensión de cerebro de *Calomys normal* se adsorbieron por duplicado durante 1 h a 37°C, a monocapas de células Vero. Luego las monocapas fueron lavadas 0, 1, 2, ó 3 veces con PBS y posteriormente fueron infectadas con una dilución apropiada de virus estándar según fue descrito.

La tabla 14 muestra los resultados obtenidos con los distintos procedimientos, observándose que la actividad interferente disminuye a medida que se diluye la suspensión de cerebro, pero aún está presente en una dilución 1:100. Además los lavados previos a la infección con virus estándar no eliminaron el factor interferente.

TABLA 14

CAPACIDAD INHIBITORIA DEL CEREBRO DEL Calomys musculinus NORMAL SOBRE LA
INFECTIVIDAD DEL VIRUS JUNIN

SUSPENSION DE CEREBRO DE <u>Calomys</u> NORMAL (dilución)	N° DE PLACAS Y % DE INHIBICION RESPECTO DEL CONTROL*			
	SIN LAVADOS	CON LAVADOS		
		1 lavado	2 lavados	3 lavados
concentrado	3,0(94%)	4,5(91%)	3,5(93%)	0,0(100%)
1 : 10	12,5(76%)	13,0(74%)	14,0(72%)	13,0(74%)
1 : 100	37,5(26%)	41,5(19%)	34,0(33%)	45,0(12%)
control sin cerebro	51,0(0%)			

*: Cada dato de la tabla es el promedio de dos experimentos. Se tomó como control el número de placas producidas por el virus cuando las monocapas fueron preincubadas solamente con medio de cultivo.

Estos resultados sugieren que la actividad interferente persiste en la célula aún cuando se intente su eliminación con lavados exhaustivos, siendo más efectiva la dilución de las suspensiones de cerebro para eliminar dicha actividad.

En consecuencia, se podría intentar diluir más de cien veces las muestras de cerebro con el objeto de hacer indetectable la actividad interferente celular. Pero dado que en materiales virales enriquecidos experimentalmente en partículas PI, se obtienen concentraciones tales que su actividad interferente no es detectable cuando son diluidas más de 100 veces, es imposible utilizar dicha estrategia.

Se planteó como alternativa la posibilidad de separar la actividad interferente celular, de las partículas PI por centrifugación diferencial. Se sabía que las partículas PI no pueden ser separadas por esta técnica de los viriones. Además Coto y col (9), demostraron que el virus Junín obtenido de cerebro de ratón blanco sedimenta con las fracciones citoplasmáticas (mitocondrial y microsomal), y que entre ambas fracciones retienen el 100% de la infectividad viral, mientras que en la fracción nuclear y soluble permanece menos del 1% de total de virus.

Con la esperanza de que la actividad interferente celular sedimentara en una sola de las fracciones citoplasmáticas, o quedara en la fracción soluble, se realizó el fraccionamiento subcelular de un homogeneizado de cerebros de Calomys adultos como se describió en Materiales y Métodos.

Con cada una de las fracciones obtenidas se realizaron sendos ensa-

yos de interferencia. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Se observa que la actividad interferente celular, se distribuye casi en su totalidad entre las fracciones mitocondrial y microsomal, presentando en consecuencia el mismo perfil de sedimentación que el virus Junín, lo cual hace imposible la separación mencionada por centrifugación diferencial.

La actividad interferente presente en núcleos y fracción soluble es debida posiblemente a contaminaciones que se eliminarían con una mayor cantidad de lavados.

Si bien se había fracasado en el logro de uno de los objetivos propuestos, como era demostrar la participación de las partículas PI en la infección persistente, el hallazgo de la actividad interferente en el cerebro del Calomys musculinus normal, planteó la posibilidad que esta actividad tuviera algún rol en la patogenia de la enfermedad.

4.4.2. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD INTERFERENTE PARA VIRUS JUNIN PRESENTE EN EL CEREBRO DEL Calomys musculinus

Las investigaciones sobre inhibidores virales han demostrado que existen normalmente un número variable de inhibidores inespecíficos para distintos virus en los fluidos corporales (suero, leche, calostro, saliva etc.), extractos de tejidos y también han sido descritos en cultivos celulares. (4,3,77)

Muchos de estos inhibidores serían producidos espontáneamente, mientras que otros serían detectados solamente después de aplicar algún estímulo externo.

TABLA 15

LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD INTERFERENTE PRESENTE EN EL CEREBRO
DEL Calomys musculinus

FRACCION SUBCELULAR	% DE INHIBICION DE DISTINTAS DILUCIONES DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES RESPECTO DEL CONTROL *		
	concentrada	1:10	1:100
núcleos	nh	7	8
mitocondrias	91	79	1
microsomas	90	47	4
fracción soluble	40	2	0
homogeneizado total	86	56	6

*: Los resultados representan los porcentajes de inhibición en el número de placas obtenidas para cada dilución de las distintas fracciones, respecto de un control de virus estándar sólo, que originó 85 placas. Cada resultado es el promedio de dos muestras procesadas simultáneamente.

Los inhibidores tienen una variada composición química y modos de acción. Algunos tienen actividad monoespecífica, mientras que otros tienen un amplio rango de acción.(37)

Con referencia al virus Junín, existe un trabajo del año 1970 de Garay y Parodi, en el que se describe la presencia de un factor inhibidor del poder infectante del virus para cultivos de células Vero, obtenido de cerebros de ratones blancos adultos normales.

Los autores propusieron como mecanismo de acción, un retardamiento en la velocidad de adsorción del virus a la célula, aumentando así la tasa de inactivación térmica del virus en el sobrenadante.

El factor inhibidor también fue aislado de ratones recién nacidos, pero presentó menor actividad que el factor obtenido de ratones adultos.
(14)

Finalmente los autores discuten un posible papel de este factor sobre el desarrollo de la resistencia a la encefalitis viral que presenta el ratón adulto respecto del ratón lactante. Postulan la probable participación del factor retardando la multiplicación viral e interfiriendo el pasaje del estímulo antigénico a la sangre, lo cual retardaría la respuesta inmunológica, que como se sabe es la efectora final de la enfermedad.

Si ahora se analizan los títulos virales obtenidos de cerebros de C.musculus crónicamente infectados, se observa que los niveles alcan^{zados} cuando los animales son infectados neonatalmente son mucho más al-

tos que para animales adultos.

Si se relacionan estos resultados con la actividad interferente mostrada por suspensiones de cerebro in vitro, se podría postular una posible correlación entre ambos factores. Así mismo, extrapolando los resultados de Garay y Parodi que demostraban una mayor actividad interferente en los cerebros de los ratones adultos, se podría suponer que la actividad antiviral presente en el cerebro del Calomys está relacionada con la madurez del animal.

Con el objeto de demostrar si existía alguna relación entre la edad del animal y la actividad interferente, se sacrificaron animales normales de 1, 7, 21, 30, y 60 días de edad y se cosecharon sus cerebros. Posteriormente se homogeneizaron cantidades iguales (1 gr) de cerebro de cada grupo.

Las distintas muestras fueron fraccionadas por centrifugación diferencial como se describió en la sección 3.12. Se conservaron las fracciones mitocondrial y microsomal, en las que se ensayó su actividad interferente.

Los resultados se muestran en la tabla 16, y se observa que no existen diferencias significativas entre las actividades interferente de los materiales ensayados, sino que por el contrario en la mayoría de las diluciones utilizadas los porcentajes de interferencia obtenidos con las muestras de cerebros de animales de 1 día son comparables con los de animales de 60 días.

En consecuencia, la posible relación entre la actividad interfe-

TABLA 16

ACTIVIDAD INTERFERENTE EN FRACCIONES SUBCELULARES DE CEREBROS DE C.musculus
NORMALES DE DISTINTAS EDADES

FRACCION MITOCONDRIAL

EDAD DEL ANIMAL (días)	% DE INHIBICION DE DISTINTAS DILUCIONES DE LA FRACCION MITOCONDRIAL RESPECTO DEL CONTROL *		
	concentrada	1:10	1:100
1	76	60	6
7	80	51	14
21	83	41	0
30	81	32	4
60	77	53	0

FRACCION MICROSOMAL

EDAD DEL ANIMAL (días)	% DE INHIBICION DE DISTINTAS DILUCIONES DE LA FRACCION MICROSOMAL RESPECTO DEL CONTROL *		
	concentrada	1:10	1:100
1	82	32	12
7	68	2	0
21	72	37	0
30	77	30	0
60	93	59	10

*: Los resultados representan los porcentajes de inhibición en el número de placas obtenidas para cada dilución de las distintas fracciones, respecto de un control de virus estándar sólo, que originó 80 placas.

rente y la madurez del animal no ha podido ser establecida para Calomys musculus.

Con el objeto de conocer algunas de las propiedades biológicas del factor (es) interferente (s) se diseñaron una serie de experimentos simples.

4.4.2.1. DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD ANTIVIRAL

Se probó la especificidad antiviral de la actividad interferente de un homogeneizado de cerebro de Calomys adulto, mediante dos ensayos de interferencia, uno frente a virus Junín y otro frente a VSV.

Los resultados de la tabla 17 muestran que la actividad interferente no es específica para virus Junín, dado que la misma inhibió el 84% de las placas de VSV en su mayor concentración.

Por otro lado, cuando la suspensión de cerebro fue diluida 1:100, ya no se inhibió la producción de placas de VSV, por lo cual se podría postular una afinidad diferente por los distintos virus.

4.4.2.2. MECANISMO DE ACCION

La actividad interferente presente en los cerebros de los Calomys, se descubrió casualmente al intentar demostrar la presencia de partículas PI de virus Junín. Dado que lo que se intentaba probar era actividad interferente de partículas virales, la metodología utilizada no contemplaba la posibilidad de inhibición viral in-vitro, sino por el

TABLA 17

DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD ANTIVIRAL DE LA ACTIVIDAD INTERFERENTE PRESENTE EN EL CEREBRO DEL *Calomys musculus*

		VIRUS			
		JUNIN		VSV	
		N° PLACAS	% INHIBICION	N° PLACAS	% INHIBICION
CONTROL DE REFERENCIA		50*	0 #	33,5	0
CEREBRO DE <i>Calomys</i> NORMAL	concentrado	4	92	5,5	84
	1 : 10	15	70	24,5	27
	1 : 100	36	28	34	0

*: el número de placas de cada ensayo es el promedio de dos muestras procesadas simultaneamente.

#: el porcentaje de inhibición esta referido al control de referencia, o sea la muestra con concentración cero de homogeneizado.

contrario siempre se colocaba el material a ensayar en contacto con las células y luego de descartarlo, se desafiaban los cultivos con virus estándar.

Los experimentos realizados demostraron que el factor interferente actuaba eficazmente cuando se lo adsorbía previamente a la infección.

Con el objeto de comprobar si la actividad interferente también se manifiesta por interacción directa con el virus in vitro, se diseñó el siguiente experimento.

Se mezclaron volúmenes iguales (0,3 ml) de homogeneizado de cerebro normal con una suspensión de virus Junín conteniendo 200 UFP. Además se preparó una mezcla control con virus y PBS.

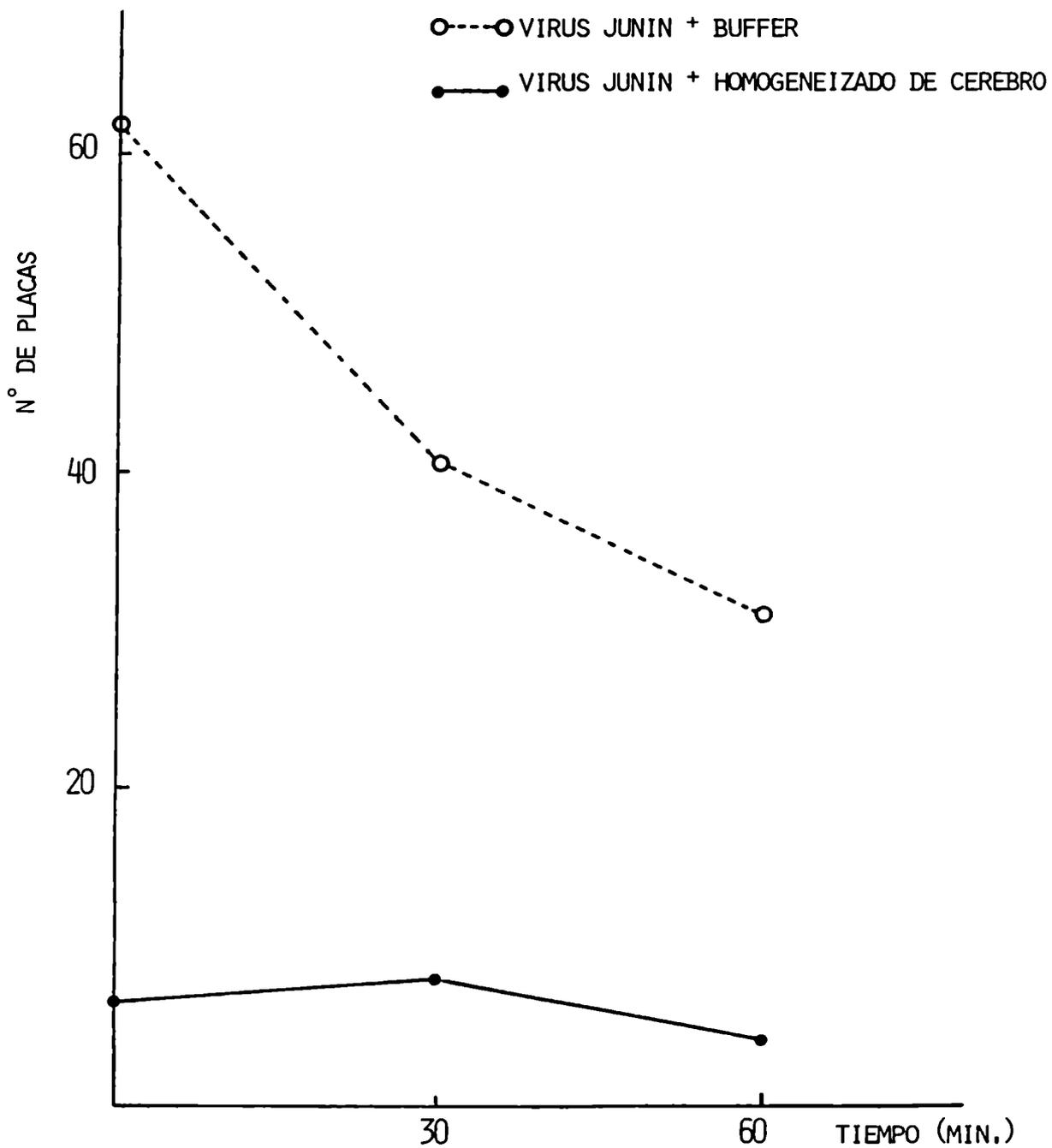
Todas estas preparaciones se realizaron por triplicado, y se incubaron a 37°C. A distintos tiempos después de la incubación, se titularon los sobrenadantes, tal como si se tratara de un ensayo de cinética de neutralización.

Los datos obtenidos fueron graficados en la figura 16. Se observa que existe inhibición in vitro y que se establece en forma inmediata. Sin embargo el esquema experimental no descarta que la acción se ejerza en el momento de la adsorción, como se demostró en los experimentos anteriores.

Estos resultados conjuntamente con los de la tabla 14, donde se demostraba que la actividad interferente está presente en homogeneizados de cerebros diluidos aún hasta 1:100, indicarían que posiblemente se obtengan resultados falsos negativos cuando se titulan homogenei-

FIGURA 16

CAPACIDAD INHIBITORIA DEL CEREBRO DEL *Calomys musculinus* SOBRE LA INFECCION DEL VIRUS JUNIN EN FUNCION DEL TIEMPO



zados provenientes de cerebros de C. musculus.

Por otro lado, comparando estos resultados con los obtenidos por Garay y Parodi, se puede concluir que los factores interferentes no son los mismos, dado que tienen distintos mecanismos de acción, ya que si bien ambos inhiben la infectividad in vitro, los autores no encontraron actividad cuando realizaron el experimento pretratando los cultivos de células Vero, previo a la infección con virus Junín.

4.4.2.3. SENSIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD INTERFERENTE A ENZIMAS PROTEOLITICAS Y SOLVENTES LIPIDICOS

La caracterización físico-química del factor interferente, se realizó en forma preliminar tratando distintas concentraciones de un homogeneizado de cerebro de Calomys normal con una solución de tripsina. Se intentó también caracterizar la sensibilidad frente a la acción de solventes lipídicos, incubando una suspensión concentrada de cerebro con cloroformo, titulando luego la actividad interferente remanente.

Los ensayos de interferencia realizados sobre las muestras tratadas con la enzima, demostraron sensibilidad de la actividad interferente a dicho tratamiento, ya que la suspensión sin diluir tratada, presentó una actividad mucho menor que el control sin enzima, y la dilución 1:10 tratada no mostró actividad. Tabla 18

Los resultados obtenidos por el tratamiento con solvente lipídico,

TABLA 18

ACTIVIDAD INTERFERENTE PRESENTE EN EL CEREBRO DEL *Calomys musculinus*:
SENSIBILIDAD A LA TRIPSINA

MATERIAL ENSAYADO	Nº DE PLACAS*	% DE INHIBICION
PBS + Stock de virus Junín# (<u>control</u>)	50	0
PBS + tripsina + stock de virus Junín (<u>control</u>)	56	0
Suspensión de cerebro concentrada + stock de virus Junín	5	90
Suspensión de cerebro 1:10 + stock de virus Junín	18	64
Susp. cerebro conc. + tripsina + stock de virus Junín	20	60
Susp. cerebro 1:10 + tripsina + stock de virus Junín	49	2

#: El stock de virus Junín fue obtenido en células Vero, con un título de 3×10^6 UFP/ml y se utilizó en dilución 1:10.000

*:Cada resultado es el promedio de dos muestras procesadas simultáneamente.

TABLA 19

ACTIVIDAD INTERFERENTE PRESENTE EN EL CEREBRO DEL Calomys musculinus:
SENSIBILIDAD AL CLOROFORMO

MATERIAL ENSAYADO	N° DE PLACAS*	% DE INHIBICION
PBS + Stock de virus Junín (<u>control</u>)	50	0
Suspensión de cerebro concentrada + Stock de virus Junín #	4	92
Suspensión de cerebro 1:10 + Stock de virus Junín	15	70
Suspensión de cerebro 1:100 + Stock de virus Junín	36	28
Susp. cerebro conc. + CHCl ₃ + Stock de virus Junín	nh	nh
Susp. cerebro 1:10 + CHCl ₃ + Stock de virus Junín	23	54
Susp. cerebro 1:100 + CHCl ₃ + Stock de virus Junín	45	12

#: El stock de virus Junín fue obtenido en células Vero, con un título de 3×10^6 UFP / ml y se utilizó en dilución 1:10.000

*: Cada resultado es el promedio de dos muestras procesadas simultáneamente

se resumen en la tabla 19. Si bien los datos de porcentajes de inhibición son menores para las muestras tratadas con cloroformo que para las no tratadas, las diferencias alcanzadas no son significativas para poder concluir sobre la presencia o no de lípidos en la actividad interferente.

Por el contrario, los resultados presentados en la tabla 18, permiten asegurar la participación de proteínas en dicha actividad.

4.4.3. CONCLUSIONES PARCIALES

La presencia de un factor inhibitorio inespecífico en el cerebro de C. musculus dificulta la interpretación de los aislamientos virales y la detección y participación de partículas PI en la persistencia viral.

Los experimentos destinados a caracterizar la actividad interferente determinaron que actúa a nivel de la adsorción viral y que su efecto puede ser revertido por dilución de los materiales a ensayar. El factor que media dicha actividad, podría tener algún papel en la patogenia viral, aunque no ha sido posible establecerlo.

4.4.4. DETECCION DE VARIANTES TERMOSENSIBLES PRESENTES EN LAS POBLACIONES VI-
RALES AISLADAS DE CEREBROS DE *Calomys musculinus* PERSISTENTEMENTE IN-
FECTADOS CON VIRUS JUNIN

Los estudios relacionados con el papel de mutantes virales en los mecanismos patogénicos de las distintas enfermedades virales, han demostrado que las mutantes de caracter termosensible (ts) presentan patogenicidad alterada para animales de experimentación.

Por ejemplo, distintas mutantes ts de VSV han producido enfermedades neurológicas lentas en ratones y hamsters, en lugar de la típica enfermedad rápida causada por las cepas salvajes. (69,70,80)

Algunas mutantes ts de sarampión son capaces de producir hidrocefalias en lugar de la encefalitis inducida por la cepa salvaje. (20) Mutantes ts de Fiebre Aftosa con virulencia reducida para el ratón, han demostrado manifestaciones leves de la enfermedad cuando son inoculadas en novillos. (72)

Estos antecedentes, conjuntamente con las evidencias aportadas por Damonte y Coto (1979), demostrando que el virus liberado por células Vero persistentemente infectadas con virus Junín es ts, hizo considerar la posible selección de mutantes ts en la infección crónica del Calomys musculinus, tal como ocurre in vitro. (13)

En primer termino se decidió determinar el tipo de población viral presente en los cricétidos persistentemente infectados y para lo cual se titularon por UFP en células Vero a 37°C y 40°C simultáneamente

algunos de los homogeneizados de cerebro de *Calomys* con aislamiento positivo en ratón lactante.

En muchos de los casos la obtención de placas se vio complicada por la existencia del factor inespecífico presente en el cerebro de los cricétidos, que fuera descrito en la sección 4.4.2..

A pesar de ello, fue posible analizar 11 homogeneizados de animales persistentemente infectados, sacrificados entre los días 40 y 343 p.i., los que fueron titulados a las temperaturas anteriormente señaladas. Con los datos obtenidos se calcularon las eficiencias de plaqueo (EDP) como la relación $UFP\ 40^{\circ}C / UFP\ 37^{\circ}C$, considerando variantes ts a aquellas muestras con EDP menor que 0,1. Los resultados se presentan en la tabla 20.

Se detectaron 7 muestras con EDP entre 0,02 y 0,008, mientras que los restantes materiales presentaron EDP inferiores al valor correspondiente a la cepa parental.

Estos resultados permiten concluir, que existe una marcada tendencia de la población viral a comportarse con características ts.

Pero este estudio solamente analizó las poblaciones virales presentes cuando ya se había establecido el estado de infección persistente, y resultaba interesante determinar si la selección de dichas mutantes se producía en forma inmediata o sufría un proceso lento de evolución con una tendencia favorable a su selección.

Con este fin se realizó un estudio de los fenotipos de los stocks de virus Junín existentes en el laboratorio (incluyendo 2 de los utilizados para iniciar las infecciones en Calomys) y de las poblaciones vi-

TABLA 20

TITULACION A 37°C y 40°C DE LAS POBLACIONES VIRALES AISLADAS DE CEREBROS DE
Calomys musculinus CRONICAMENTE INFECTADOS

TIEMPO DE SACRIFICIO (días p.i.)	TITULO #		EFICIENCIA DE & PLAQUEO (40/37)
	37°C	40°C	
40	$6,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	0,057 *
90	$7,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	0,02 **
94	$8,9 \times 10^2$	$8,9 \times 10^1$	0,1
94	$2,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	0,008 *
129	$3,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^4$	0,0085*
130	$1,5 \times 10^4$	$4,1 \times 10^2$	0,027 *
161	$2,7 \times 10^4$	$1,9 \times 10^3$	0,07 *
200	$5,0 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	0,56
225	$1,1 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$	0,22
343	$3,7 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	0,086 *
343	$2,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	0,1

#: expresado en UFP/ml.

&: EDP del virus parental: 0,61

*: población viral enriquecida con variantes ts.

rales aisladas de los cricétidos inoculados y sacrificados a distintos tiempos p.i..

En la figura 17 se han graficado los logaritmos de las EDP que presentaron las distintas muestras estudiadas.

El análisis comparativo de los resultados muestra que la evolución de la persistencia está correlacionada con una disminución en los valores de EDP.

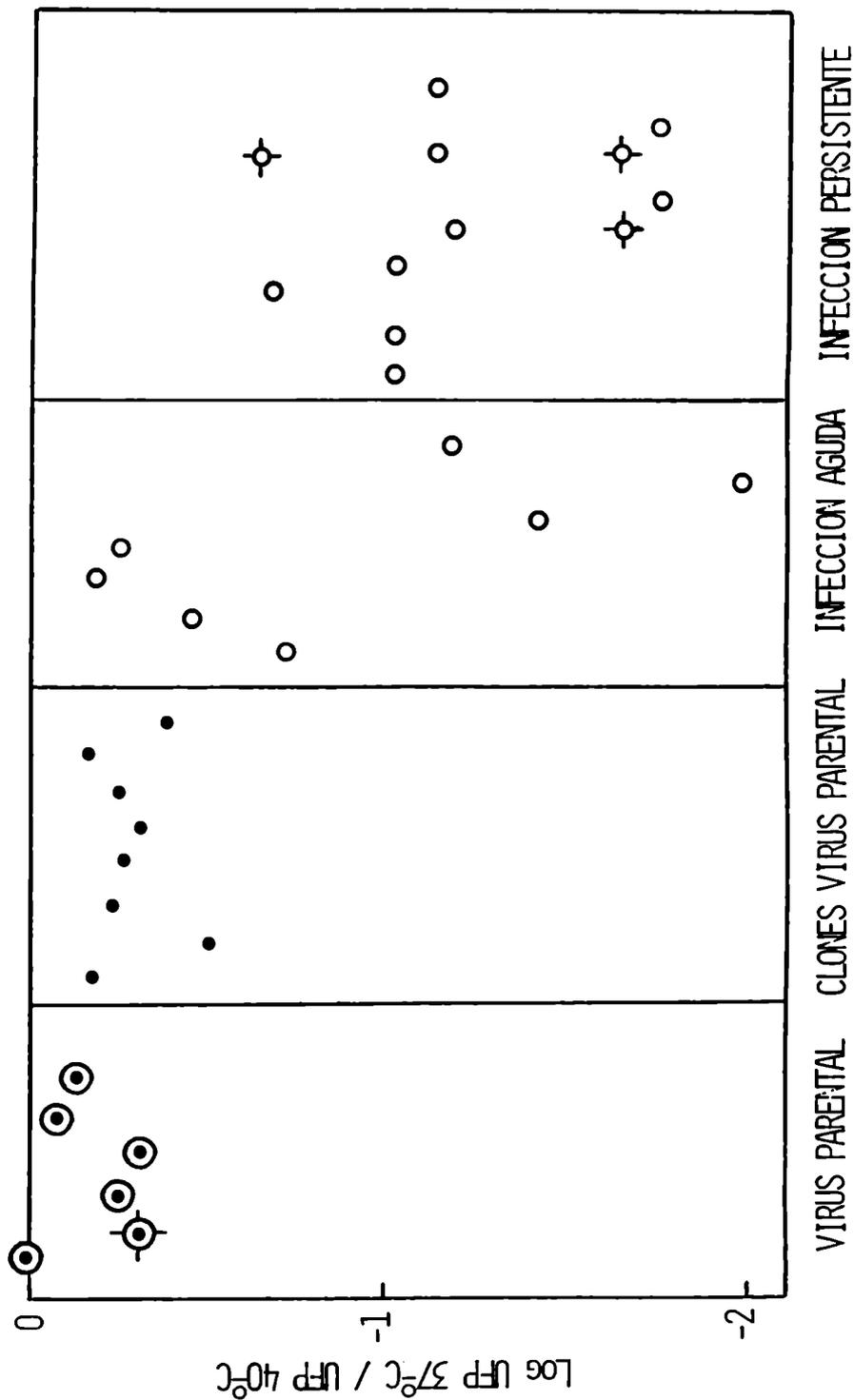
Como se puede observar en la figura 17A, los valores de log de EDP obtenidos para los stocks de virus Junín no presentaron mucha dispersión y se distribuyeron en un estrecho rango (0 a -0,45), demostrando que dichas poblaciones tienen EDP muy cercana a 1.

En cambio, el perfil de las poblaciones virales obtenidas durante la fase aguda (figura 17C), muestra ya una tendencia a valores de log de EDP menores (-0,13 a -1,88); que se pone totalmente de manifiesto cuando se analizan los resultados obtenidos para animales persistentemente infectados (figura 17D), donde la mayoría de los logEDP están por debajo de -1, llegando a valores tan bajos como -2,1, demostrando así un enriquecimiento de las poblaciones virales en variantes ts en función del tiempo.

Por otro lado, se podría argumentar que las variantes ts estaban originalmente presentes en el stock parental, dado que si bien dichos stocks no demostraron variaciones importantes entre sus respectivas EDP, no se puede descartar la posibilidad que existieran variantes ts cuyos fenotipos fueran enmascarados por estar en poca cantidad, dado que las preparaciones virales obtenidas de cerebro de ratón así como

FIGURA 17

FENOTIPO ts DE VIRUS JUNIN AISLADO DE *Calomys musculinus* PERSISTENTEMENTE INFECTADO



de cultivo de tejidos son poblaciones heterogéneas.

Con el objeto de poner de manifiesto dicha heterogeneidad y poder establecer la existencia o no de variantes ts en los stocks de virus con que se iniciaron las infecciones, se analizaron clones virales derivados de dichos stocks, como se puede ver en la columna B de la figura 17.

El análisis de 8 clones derivados del stock cuya EDP ha sido graficado como una estrella (\odot) en la columna A de la figura 17, demuestra que no hay ningún clon ts y que además el rango de log de EDP obtenido (-0,16 a - 0,48) es similar al presentado por los stocks de la columna A. En consecuencia, si existen variantes ts en los stocks de partida, las mismas estarían en tan baja proporción que el muestreo realizado no pudo detectarlas.

Por otro lado, el análisis de las poblaciones virales aisladas durante las etapas aguda y crónica, muestra una marcada tendencia hacia la selección de poblaciones virales ts que persisten en los cerebros de los animales. Además esta selección ocurre en casi todos los animales estudiados y de manera bastante rápida, lo cual no apoyaría la hipótesis de que estas variantes se han derivado de otras preexistente en los pequeños inóculos con que se inician las infecciones.

Las poblaciones virales obtenidas de cerebros de C. musculus, también son heterogéneas en su composición, y algunas están más enriquecidas que otras en variantes ts.

Con el objeto de confirmar este punto y demostrar que el fenotipo ts es estable, al menos luego de dos pasajes por un sustrato celular dife-

al del C. musculus, se obtuvieron clones virales de dos poblaciones aisladas de cerebro de Calomys que habían presentado características ts.

Para tal fin estos materiales fueron plaqueados en células Vero y los clones obtenidos fueron amplificados a 37°C y 40°C, durante 72 hs. Posteriormente los sobrenadantes de los cultivos infectados, fueron titulados por formación de placas a 37°C, calculándose la EDP en base a las dos temperaturas de crecimiento.

Las EDP calculadas se graficaron en la figura 17D como estrellas (\odot) en las mismas columnas de las EDP de las muestras de que fueron clonadas.

Para una de las muestras con EDP:0,027 (log EDP: -1,57) se obtuvieron dos clones, uno con EDP :0,25 (log EDP: -0,6) y otro con un marcado fenotipo ts con EDP: 0,018 (log EDP: -1,75).

Para la otra muestra estudiada con EDP: 0,07 (log EDP: -1,16), se obtuvo solamente un clon que presentó una EDP: 0,025 (log: -1,60), demostrando así un mayor carácter ts que la población de la que se obtuvo.

Por lo tanto se comprueba que las poblaciones no son puras y que las mismas se enriquecen en partículas ts. Por otro lado, el fenotipo ts es estable aún después de crecer las variantes en células Vero, descartando así que el fenómeno observado fuera un artefacto causado por la multiplicación viral en los cerebros de C. musculus.

Este fenómeno, así mismo, ha sido analizado por Holland (26) y cada vez es más encontrado en la bibliografía de distintos modelos virales.

4.4.5. DETECCION DE VARIANTES SEROLOGICAS EN LA INFECCION CRONICA DEL Calomys musculus CON VIRUS JUNIN

Las alteraciones antigénicas a nivel de proteínas de la superficie viral, causadas por mutaciones, han demostrado ser uno de los mecanismos que permitiría a los virus escapar de la vigilancia inmunológica, evitando ser reconocido por los anticuerpos circulantes, estableciendo así una infección persistente.

Este mecanismo ha sido descrito en caballos que sufren Anemia infecciosa equina (35) y en ovejas portadoras del virus Visna (52,53).

Correlacionando estos conocimientos con una de las mayores incógnitas planteadas por el presente modelo de infección, como es la coexistencia de virus en distintos órganos y viremias fugaces, con altos títulos de anticuerpos neutralizantes, llevó a plantear la posibilidad de la existencia de una desviación antigénica para el presente modelo viral.

Para comprobar esta hipótesis, se compararon muestras de virus aislado de Calomys persistentemente infectados con el virus parental mediante técnicas serológicas, para comprobar posibles variaciones antigénicas.

Con este fin se realizaron ensayos de neutralización in vitro, enfrentando diluciones de los sueros de cuatro animales crónicamente infectados, con las poblaciones virales aisladas de los cerebros o glándulas salivales de dichos animales. Simultáneamente los mismos sueros se enfrentaron con el virus parental con que se inició la infección (proveniente de un stock obtenido de cerebro de ratón blanco) y al mis-

mo virus parental pero con un pasaje posterior por cerebro de Calomys musculus neonato (Tabla 21).

Los resultados de la tabla 21, muestran que los sueros de los cricétidos neutralizan en alto título a la cepa parental, obtenida en ratón blanco, mientras que la capacidad de neutralizar a su propio virus está reducida notablemente, siendo la diferencia entre los títulos de por lo menos tres diluciones seriadas en base dos, en la mayoría de los casos.

El mismo comportamiento se observó al comparar los títulos obtenidos usando como antígeno la cepa parental con un pasaje por C.musculus neonato v el virus propio de cada animal, con lo que se puede descartar que el fenómeno sea debido a una influencia del sustrato celular donde multiplica el virus.

Otro dato interesante, fue el obtenido con el Calomys 124₅ que presentó variantes serológicas tanto en la población aislada de cerebro así como en la de glándulas salivales.

Estos resultados permiten confirmar la aparición de variantes serológicas en las poblaciones virales persistentes en Calomys musculus, y serán tratados más extensamente en la discusión.

TABLA 21

TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE SUEROS DE *C. musculus* CRONICAMENTE INFECTADOS CON VIRUS JUNIN, FRENTE AL VIRUS PARENTAL Y AL VIRUS PERSISTENTE.

SUERO <u>Calomys</u> N°	VIRUS			
	CEPA PARENTAL (1) (ratón blanco)	CEPA PARENTAL (2) (<u>Calomys</u> neonato)	PERSISTENTE (3) (cerebro)	PERSISTENTE (4) (glánd.salival)
114 ₃ ^(a)	2560 ^(c)	5120	320 (¹¹⁴ ₃)	nh
115 ₃ ^(a)	2560	2560	320 (¹¹⁵ ₃)	nh
119 ₇ ^(b)	2560	nh	640 (¹¹⁹ ₇)	nh
124 ₅ ^(b)	1280	nh	160 (¹²⁴ ₅)	160 (¹²⁴ ₅)

(1): cepa parental proveniente de cerebro de ratón blanco.

(2): cepa parental con un pasaje por cerebro de Calomys musculus neonato.

(3): virus persistente obtenido del cerebro del Calomys cuyo número figura entre paréntesis.

(4): virus persistente obtenido de las glándulas salivales del Calomys cuyo número figura entre paréntesis.

(a): animal inoculado por vía i.n. y sacrificado a los 70 días p.i.

(b): animal inoculado por vía i.p. y sacrificado a los 80 días p.i.

(c): título de anticuerpos neutralizantes expresado como la mayor dilución de suero que redujo el 80% de las placas virales, respecto de un control de virus tratado con suero de *C. musculus* normal. Para las distintas columnas, el control se realizó con el virus correspondiente.

4.4.6. PARTICIPACION DEL INTERFERON EN LA INFECCION PERSISTENTE DEL *Calomys musculus* CON VIRUS JUNIN.

La participación del interferón (IFN) en la patogenia de distintas enfermedades virales ha sido claramente establecida para distintos modelos de infección aguda y crónica.

Los estudios sobre IFN relacionados con virus Junín, indican que el virus induce bajos niveles de la proteína antiviral, tanto in vitro como in vivo, en los sistemas ensayados (pollo y ratón in vitro y ratón y cobayo in vivo). (27,83)

Un estudio realizado sobre la infección persistente de células de ratón con virus Junín, permitió postular que en ese sistema se produce IFN que actúa como factor regulador de la persistencia. (89)

Considerando la inducción de bajos niveles de IFN por virus Junín como parte de la estrategia del agente para lograr su perpetuación en la naturaleza, se planteó el interrogante de la importancia del IFN en el establecimiento o mantenimiento de la persistencia en el Calomys.

Con el fin de investigar esta cuestión, se desarrolló un esquema experimental para ensayar actividad de IFN en bazo de Calomys persistentemente infectados con virus Junín o sanos.

Los sobrenadantes de homogeneizados de dichos órganos se trataron y probaron como se detalló en las secciones 3.17 y 3.18 de Materiales y Métodos.

En la tabla 22 se puede observar que todos los materiales provenientes de animales persistentemente infectados fueron capaces de inhibir

la multiplicación del virus VSV significativamente, pero los porcentajes de inhibición obtenidos a partir de muestras de bazo de animales sin infectar (controles normales), fueron tan altos como los de animales infectados. Solamente 1 control de 4 que se estudiaron, presentó bajo porcentaje de inhibición.

Estos resultados no permiten sacar ninuguna conclusión en relación con el rol del IFN en la infección persistente, aunque demuestran una producción basal de IFN en algunos de los animales de nuestra colonia.

Los estímulos que provocan esta producción de IFN no se conocen, pero podrían deberse a cualquier infección inaparente presente en la colonia de animales, dado que estos cricétidos no están libres de patógenos y solamente son testeados por la presencia de virus Junín o LCM.

TABLA 22

PRESENCIA DE INTERFERON EN LOS BAZOS DE Calomys musculus INFECTADOS O NO CON VIRUS JUNIN.

MATERIAL ENSAYADO	TITULO DE VIRUS	% DE INHIBICION
medio de cultivo (control) .	$2,36 \times 10^8$	0,0
C.m. 31 _b *	$1,40 \times 10^8$	40,6
C.m. 12 _{a7} *	$1,83 \times 10^7$	92,3
C.m. 24 _{a4} *	$3,23 \times 10^6$	98,6
C.m. 33 _{b2} *	$3,70 \times 10^7$	84,3
C.m. 30 ₅ *	$1,15 \times 10^6$	99,5
C.m. 28 ₄ *	$5,20 \times 10^7$	77,9
C.m. normal 1	$6,83 \times 10^8$	4,5
C.m. normal 2	$5,03 \times 10^6$	97,9
C.m. normal 3	$4,90 \times 10^5$	99,8
C.m. normal 4	$9,60 \times 10^7$	95,9

#: expresado en UFP / ml.

*: Calomys musculus persistentemente infectados, sacrificados a distintos tiempos p.i., luego de superar los 60 días de infección.

5. DISCUSION

Dado que el Calomys musculinus tiene un papel preponderante en el mantenimiento del virus Junín en la naturaleza, el presente trabajo estuvo dirigido al conocimiento de la interacción virus - huésped, bajo condiciones de laboratorio, que intentaron reflejar la infección natural.

Con este propósito se consideraron tres factores principales: el huésped, la cepa de virus, y la vía de inoculación.

El huésped: Se mantuvo una colonia de Calomys musculinus cerrada pero no endocriada, con el objeto de no seleccionar ningún carácter genético especial, que pudiera favorecer una determinada respuesta a la infección.

Todos los animales inoculados fueron sensibles a la infección, demostrando que ellos no son resistentes naturalmente. Aún así, los diferentes perfiles de infección en neonatos o adultos, podrían ser debidos a factores de heterogeneidad genética. Esta posibilidad podrá ser confirmada cuando se cuente con una colonia de C. musculinus endocriada.

La morbimortalidad fue edad dependiente. Las muertes de los animales fueron debidas a severas meningoencefalitis, asociadas con la replicación viral. Los animales sobrevivientes a la infección, pueden estar persistentemente infectados o haber clarificado el virus. En ambos casos se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes, pero las lesiones en cerebro estuvieron solamente asociadas con presencia de virus.

Aparentemente la inmunidad humoral no jugaría un papel fundamental en la eliminación del virus, ni en la producción de lesiones. Aún así la presencia de anticuerpos puede ser responsable de la falta de viremias detectables luego de la etapa aguda de la infección, aunque esta situación sería revertida con la aparición de variantes serológicas que escaparían a la vigilancia inmunológica humoral.

Esta situación es similar a la presentada en la infección crónica del ratón con virus LCM, en la cual también aparecen anticuerpos que no son eficaces para la eliminación viral. (19)

Cena de virus: Por razones de seguridad se trabajó con la cepa XJ Cl₃ de virus Junín, atenuada para el hombre. Esto podría sugerir que el uso de una cepa de laboratorio puede cambiar el patrón de la infección, pues las cepas naturales son virulentas para el hombre. Esto puede ser verdad y será discutido más tarde, pero alternativamente, no hay ninguna razón para descartar la existencia de cepas avirulentas en la naturaleza. Es sabido que el número de casos de Fiebre Hemorrágica Argentina ha disminuido drásticamente desde 1958. (17) Además, muchos individuos en el área endémica han presentado anticuerpos específicos contra virus Junín sin enfermedad previa, indicando la existencia de infecciones subclínicas o inaparentes, lo que podría deberse a infecciones con cepas atenuadas. (17, 95, 96)

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que en el binomio Calomys musculinus - XJ Cl₃ la aparición de las lesiones está determinada por la presencia de virus, y que la respuesta humoral no es suficien-

te para la eliminación viral en la mayoría de los casos.

Estas observaciones difieren de las halladas en Calomys musculinus infectados con cepas patógenas de virus Junín. En esta situación a pesar de haberse encontrado por inmunofluorescencia un gran número de neuronas con determinantes antigénicos virales, no fue posible aislar virus infeccioso, ni descubrir lesiones anatomopatológicas.

Otra diferencia encontrada cuando se comparan los resultados obtenidos con estas cepas es la eliminación de virus por orina y saliva.

Por otro lado, en el modelo con XJ Cl₃ no se obtuvieron distintas respuestas al variar la dosis inoculada, mientras que utilizando cepas de campo la eliminación de virus fue dependiente de la dosis, cepa y edad de los animales al momento de la infección. (76)

Las variaciones de los patrones de infección dependiendo de la cepa de virus Junín utilizada, se conocen también en otros sistemas animales como rata (2), cobayo (38) y marmoset (15). Es interesante señalar el marcado neurotropismo de la cepa XJ Cl₃ en todos estos huéspedes.

Estos resultados sugieren una reflexión sobre la definición de los marcadores de virulencia o alternativamente de atenuación para una determinada cepa de virus. Es conocido que de todas las cepas de virus Junín, la XJ Cl₃ es la más atenuada, sin embargo no se comporta como tal en C.musculinus a diferencia de las cepas salvajes que no causan enfermedad en esta especie, por lo que sería muy importante definir estos marcadores con precisión para cada especie y condiciones, y ser muy precavido para efectuar extrapolaciones.

Vías de inoculación: La diferencia más marcada entre las dos vías utilizadas, fue que los C.musculus mayores de 21 días no fueron susceptibles a la infección por vía i.p..

Los resultados obtenidos al infectar adultos por vía i.n. y con hembras infectadas naturalmente cuando amamantaban crías inoculadas, confirmaron que en la naturaleza puede existir transmisión horizontal.

Los estudios realizados sobre transmisión vertical, demuestran que la misma no ocurre. Si estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Sabattini y col (76), se puede concluir que la transmisión de padres a hijos solamente se consigue por contacto con secreciones de los padres contaminadas con virus, cuando ha terminado la etapa de lactancia, dado que hasta entonces existiría una protección pasiva por anticuerpos maternos, aunque esta posibilidad aún no ha sido demostrada.

Un análisis comparativo de las vías i.p. e i.n., demuestra una morbilidad significativamente menor para la última.

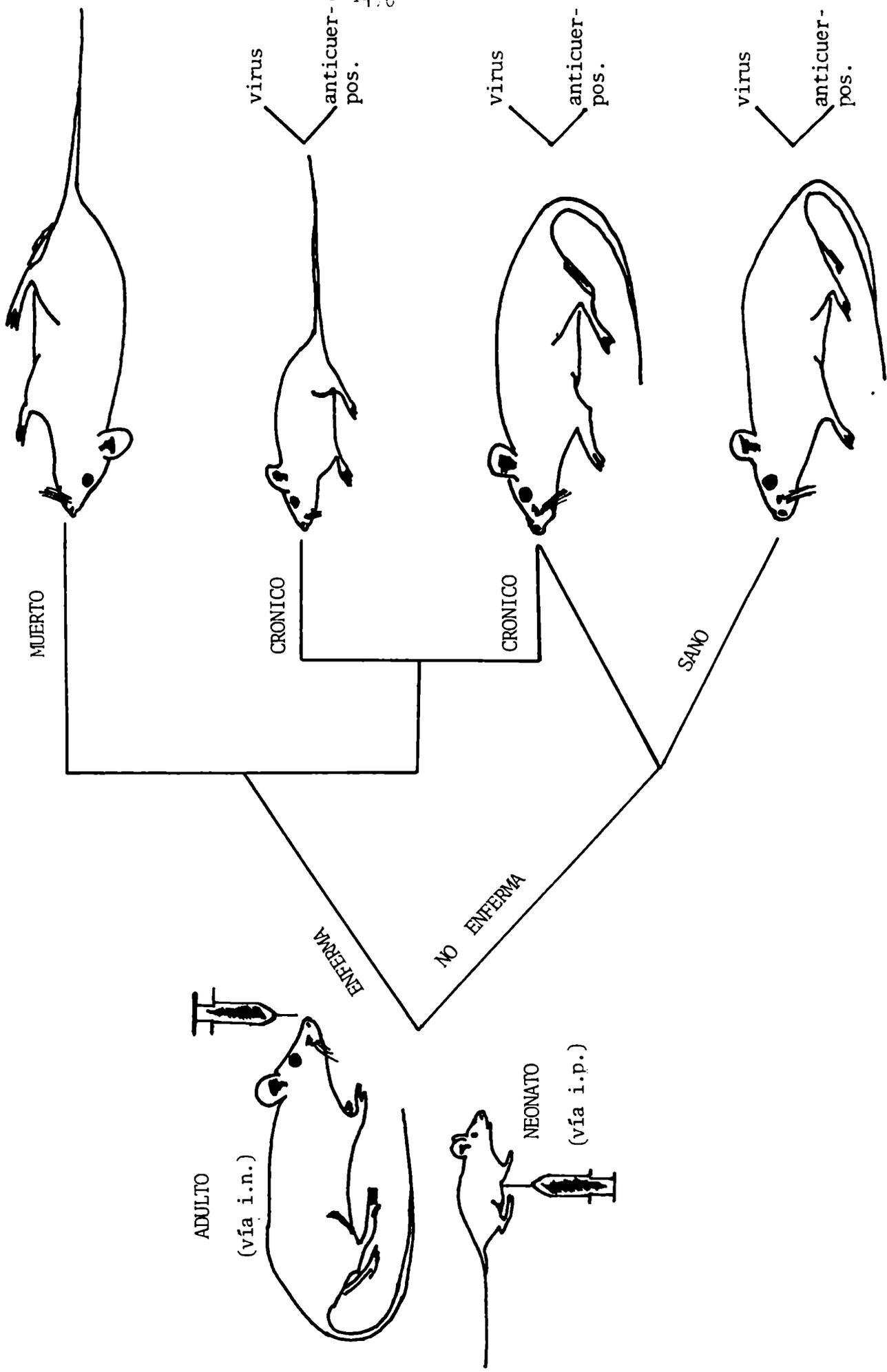
Ambas vías de inoculación tuvieron como órgano blanco de la infección al cerebro, y ocasionalmente las glándulas salivales. Mientras que en la infección natural de las hembras nodrizas, se encontró también involucrado el bazo durante la persistencia viral, aunque en ningún caso pudo aislarse virus infeccioso de este órgano.

Resumiendo las características de este modelo experimental de infección persistente se presentan las figuras 18 y 19.

El esquema de la figura 18, muestra el curso de la infección experimental del Calomys musculus con virus Junín, cuando se inoculan ani

FIGURA 18

CURSO DE LA INFECCION DEL Calomys musculinus CON VIRUS JUNIN (cepa XJ CI₃)



males adultos o neonatos por vía i.n. o i.p..

Se puede distinguir una primera etapa, fase aguda, durante la cual los animales pueden enfermar o no, en porcentajes variables según la vía de inoculación. Una proporción de los cricétidos enfermos, muere, y los sobrevivientes presentan un estado de infección persistente con presencia de altos títulos de virus y de anticuerpos neutralizantes.

Algunos de los animales crónicamente infectados quedan disminuidos en tamaño, como secuela de la infección aguda.

Los animales que no presentaron síntomas, pueden a su vez convertirse en portadores del virus aparentemente sanos o haberlo eliminado definitivamente, pero en ambos casos se detectan altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

La figura 19 resume las características de la infección experimental del C. musculinus neonato, de 1 a 2 días de edad, que con algunas pequeñas diferencias son similares a las presentadas por los animales de hasta 11 días de edad.

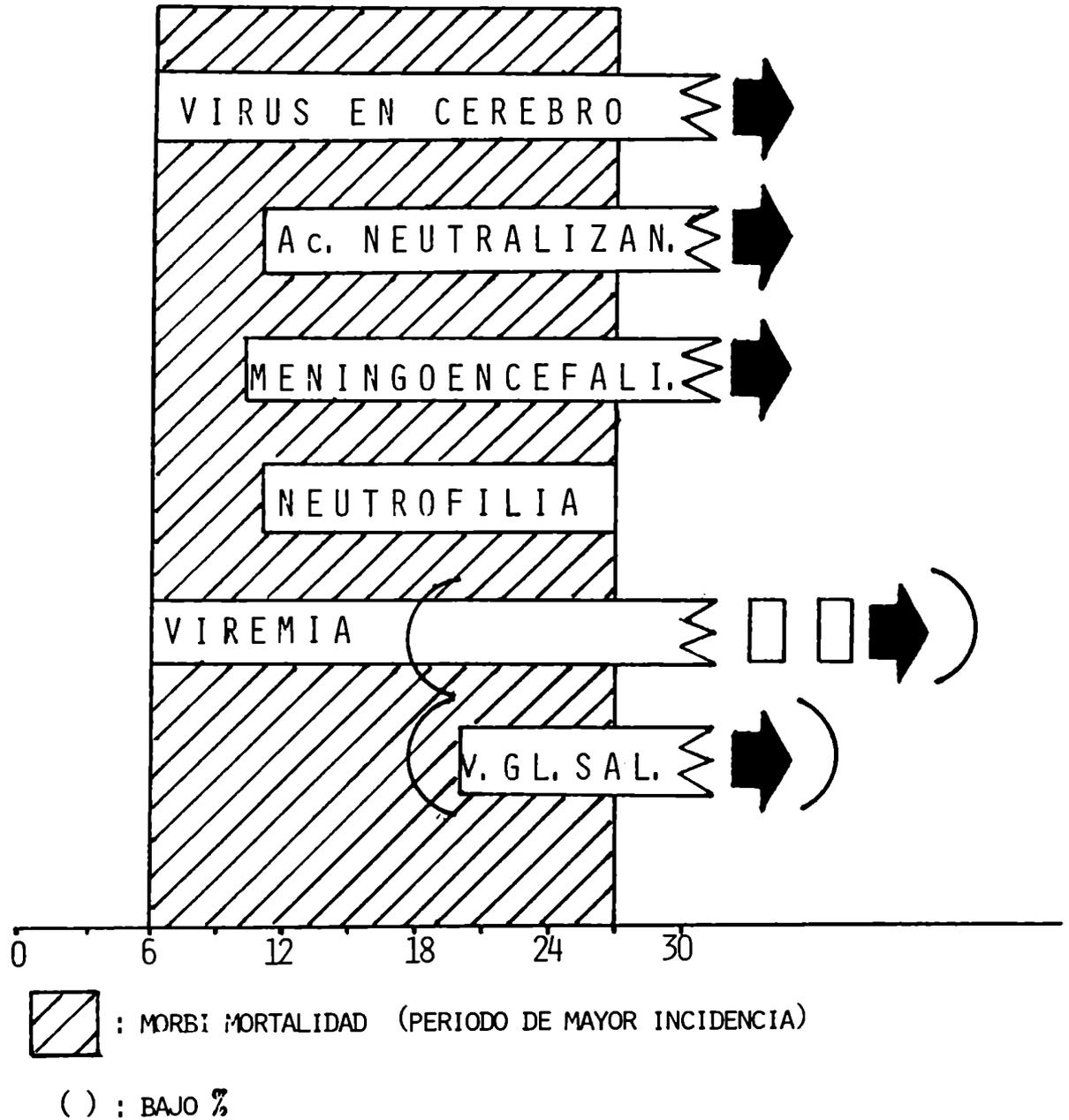
Los resultados mostraron un 90 % de morbilidad con dos días de incidencia predominante, 7 y 15 p.i.; 70 % de mortalidad con mayor prevalencia entre los días 16 y 20 p.i..

Los aislamientos virológicos a partir de sangre, demostraron viremia desde el día 4to p.i. haciéndose más marcada alrededor del día 13 p.i.

Se aisló virus de cerebro a partir del día 6 p.i., alcanzando un valor máximo al día 11 p.i.

FIGURA 19

CARACTERISTICAS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DEL C. musculus NEONATO CON VIRUS JUNIN



Por otro lado, estudios hematológicos realizados en este laboratorio por Steyerthal y col., mostraron una importante neutrofilia, así como un aumento en el número de monocitos, entre los días 13 y 18 p.i., encontrando en algunos casos predominio de neutrófilos respecto de la cantidad de linfocitos totales. (comunicación personal)

Se puede observar que alrededor de la segunda semana de infección se encuentran los máximos títulos virales, conjuntamente con un marcado aumento en el número de neutrófilos y monocitos, hechos que son concomitantes con los mayores porcentajes de morbimortalidad. Estos resultados más los aportados por los estudios anatomopatológicos, que informan el desarrollo de meningoencefalitis, más o menos severas según los casos, conjuntamente con la detección de anticuerpos neutralizantes a partir del día 11 p.i., hacen presumir que las alternativas entre el establecimiento de una infección persistente, la eliminación viral o la muerte se establecen durante este período, según sea el equilibrio establecido entre los factores mencionados. Además a partir de este momento se comienzan a seleccionar variantes virales que pueden favorecer la persistencia viral.

Los animales que superan la etapa crítica, tienden a normalizar su hematología, presentan en todos los casos anticuerpos neutralizantes, con presencia o no de virus en cerebro, hecho que tiene aparejado la existencia o no de lesiones encefálicas.

La viremia se negativiza con la aparición de los anticuerpos, aunque posteriormente se pueden detectar algunas viremias fugaces, posiblemente-

te causadas por la generación de variantes serológicas que escapan a la vigilancia humoral.

La presencia de virus en glándulas salivales se pudo detectar a partir del día 20 p.i., aunque la infección de estas glándulas tuvo menor incidencia que la presentada por el cerebro.

Los resultados presentados en este trabajo, indican que la infección del Calomys musculinus con la cepa XJ Cl₃ de virus Junín conduce a una situación única, diferente de las presentadas en otras infecciones de huéspedes naturales (Calomys callosus con virus Machupo (94), Mastomys natalensis con virus Lassa (91), Sigmodon hyspidus con virus Tamiami (97) y Mus musculus con virus LCM (148)), en las que la infección perinatal lleva a infecciones persistentes con alta producción de virus, pero con ausencia de lesiones o síntomas clínicos.

En algunos aspectos, los resultados obtenidos en este trabajo, son similares a los informados para otras infecciones crónicas de arenavirus en roedores de laboratorio, diferentes de los reservorios naturales.

Por ejemplo se puede citar la infección de la rata con los virus Junín o LCM (2,50), y del ratón y rata con virus Tamiami (97). Aún así, aunque en estas situaciones ocurre daño encefálico, la aparición de anticuerpos neutralizantes determina la desaparición de virus infeccioso de cerebro.

El hecho de que en todos los Calomys que mostraron síntomas clíni-

cos o lesiones en cerebro, se aislara virus Junín de cerebro, indica que es necesaria una infección productiva para la aparición de daño hístico.

Con las evidencias presentes no es posible establecer si las alteraciones observadas, son debidas a efecto citopático directo del virus, o si están operando alternada o simultáneamente mecanismos inmunopatológicos, como ocurre en la mayoría de las infecciones con arenavirus. (40,41)

Sin embargo, diversos experimentos realizados en este laboratorio por Coulombie, con *C. musculus* infectados con virus Junín y tratados con ciclofosfamida o suero antitimocito, permiten alentar la posibilidad de que las lesiones sean producto de una inmunopatología de origen esencialmente celular. (10)

Por otro lado, es importante recordar que la infección crónica no mata al animal, ni aún en forma tardía, dado que se han estudiado animales de hasta 500 días p.i. Además la esperanza de vida del Calomys musculus silvestre no supera los 90 días de edad, por cuanto aunque la infección crónica tuviera algún efecto letal a largo plazo (no detectado en este trabajo), no tendría ninguna significación sobre la cadena ecológica del virus en la naturaleza, dado que el contagio entre animales ocurriría muchos antes de que los efectos tardíos pudieran manifestarse.

ESTRATEGIA VIRAL PARA EL ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE INFECCIONES
PERSISTENTES EN *Calomys musculinus*

Los antecedentes sobre factores involucrados en la regulación de las infecciones persistentes para arenavirus, asignaban un rol preponderante a la síntesis de partículas defectivas interferentes (PI). Estas observaciones fueron hechas fundamentalmente con el modelo de LCM y algunos trabajos realizados con virus Paraná.

El virus Junín parece apartarse en parte de estos mecanismos de persistencia viral, ya que Damonte y Coto han demostrado en células Vero infectadas persistentemente con este virus, que la progenie viral liberada es termosensible y no interfiere con la replicación del virus salvaje. (13)

Los resultados obtenidos en este trabajo, refuerzan los datos logrados in vitro, confirmando la participación de mutantes ts. Así mismo se demostró la aparición de variantes serológicas. Este resultado es de significativa importancia, dado que es la primera vez que se informa la existencia de estas variantes para algún arenavirus.

La importancia y posibles roles que puedan tener estas variantes serán discutidas a continuación.

Por otro lado, como ya se mencionara, se tenían evidencias de la participación de partículas PI en el mantenimiento de infecciones persistentes en células Vero. (21,22)

Los intentos por demostrar su participación en el presente modelo de infección crónica, fueron infructuosos por la existencia de una ac-

tividad antiviral inespecífica en el cerebro del Calomys musculinus.

Si bien la metodología disponible no permitió diferenciar la actividad interferente inespecífica, de la **que** posiblemente ejercieran las partículas PI, el autor está convencido de la existencia de dichas partículas, fundamentando su hipótesis en los siguientes hechos:

- Las preparaciones virales con que se inocularon los animales no estaban libres de partículas PI.

- Help y col han demostrado que aún partiendo de preparaciones virales libres o con muy bajo título de partículas PI, luego de algunos ciclos de multiplicación viral se pueden detectar dichas partículas. (21)

- Estudios realizados sobre persistencia de virus Junín en cultivos en estado estacionario, han demostrado la participación de las partículas PI en el mantenimiento de la persistencia.

Dado que la infección crónica del Calomys musculinus se establece fundamentalmente por la persistencia del virus en el cerebro, y considerando que ciertos aspectos fisiológicos del cerebro se pueden homologar a los de un cultivo en estado estacionario, tal vez algunos de los conocimientos de los estudios in vitro, puedan ser extrapolados al presente modelo.

Por otro lado, los intentos preliminares por caracterizar la actividad interferente del cerebro, demostraron que la misma está presente en las fracciones subcelulares **mitocondrial** y **microsomal**. Además se determinó su sensibilidad al tratamiento con tripsina, lo que

permitió inferir que en su composición intervienen proteínas. Los experimentos para establecer la susceptibilidad de la actividad interferente al tratamiento con solventes lipídicos no arrojaron datos concluyentes.

Los estudios sobre los posibles mecanismos de acción, demostraron que la inhibición de la infectividad viral se produciría a nivel de la adsorción o penetración del virus a la célula, dado que es tan efectiva su acción, preincubando el inhibidor con las células a infectar o mezclando previamente a la infección, el virus con el inhibidor.

El rol del interferón en el presente modelo no pudo ser establecido, dado que existe aún en los animales normales una síntesis basal de interferón que imposibilitó llegar a conclusiones ciertas al respecto. Esta síntesis inespecífica podría deberse a algún patógeno presente en nuestra colonia.

PARTICIPACION DE MUTANTES TERMOSENSIBLES EN LA INFECCION CRONICA DEL *Calomys musculus* CON VIRUS JUNIN

Los experimentos realizados para caracterizar las poblaciones virales presentes en el cerebro de los Calomys crónicamente infectados demostraron un enriquecimiento de las mismas en variantes ts.

Esta selección se produce desde tiempos muy tempranos de infección.

Las diferencias de EDP entre la cepa parental y las poblaciones virales persistentes, demuestran que las mutantes ts replican más rápida-

mente o interfiriendo con la cepa parental, dado que el enriquecimiento en función del tiempo es muy marcado.

Los estudios realizados a partir de clones obtenidos de las poblaciones virales persistentes, permitieron concluir que el fenotipo ts no se revierte por el crecimiento de las variantes, en cultivos celulares, lo que descartaría que la característica ts esté asociada con la constitución de las membranas de los distintos sustratos celulares.

Se sabe que algunas de las ventajas selectivas de las mutantes ts sobre la cepa salvaje, es una menor patogenicidad sobre el huésped. (20, 70, 72)

En este trabajo no se pudo correlacionar el carácter ts con una menor virulencia, dado que las muestras ts obtenidas se almacenaban en un equipo refrigerador de -70°C , que se descompuso y estuvo durante un tiempo prolongado a temperatura ambiente, con la consiguiente pérdida de los materiales. Por la misma causa no se pudo establecer la relación biunívoca entre las variantes serológicas y las ts.

VARIACION ANTIGENICA DEL VIRUS JUNIN EN *Calomys musculinus* PERSISTENTEMENTE INFECTADOS

El bajo grado de neutralización del virus aislado de *C. musculinus* persistentemente infectados, por el suero del mismo animal, comparando el título de este suero frente a la cepa parental, indica la aparición de mutantes serológicas dentro de la población viral persistente.

La variación antigénica, probablemente involucre a las glicopro-

teinas de la envoltura viral, ya que estos componentes virales son los que interactúan con los anticuerpos durante el proceso de neutralización viral. Posiblemente esta modificación antigénica sea solamente en una parte de los distintos determinantes antigénicos de la glicoproteína, permaneciendo otros inalterados. Esto se puede suponer, dado que cuando se realizan ensayos de neutralización con una población viral que posee variantes serológicas, enfrentándola con el suero del mismo animal, pero ahora poco diluido, la infectividad viral se negativiza totalmente.

Las variantes antigénicas son bien conocidas en Microbiología, especialmente en infecciones crónicas con protozoarios. Uno de estos modelos, y tal vez el mejor estudiado es el del tripanosoma africano, que infecta persistentemente al ganado bovino. (88)

En Virología existen algunos reportes de variaciones antigénicas, con dos modelos bien estudiados (Anemia infecciosa equina (35) y Visna (52,53)). El virus de la Anemia infecciosa equina, que infecta en forma persistente a los caballos, produce una enfermedad que presenta viremias recurrentes asociadas con hemólisis y fiebre. La enfermedad desaparece con la aparición de anticuerpos neutralizantes y reaparece con el desarrollo de variantes serológicas en plasma. (35)

La infección crónica del Calomys musculinus, asociada a lesiones meningoencefálicas permanentes, no es una enfermedad con sintomatología recurrente, sino que como sucede en el modelo de ovejas infectadas con virus Visna, en las que se desarrolla una infección neurológica pro-

gresiva, el mantenimiento de la infección sin recuperación de las lesiones encefálicas sería debido a la liberación intermitente de virus alterado antigénicamente. Esta liberación intermitente se correlacionaría con la aparición de viremias fugaces, que posteriormente por una reacción del sistema humoral sería clarificada.

La selección de variantes serológicas sería una respuesta viral a la gran presión inmunológica ejercida por medio de los anticuerpos neutralizantes; esta alternativa no sería limitada a la población viral del cerebro, sino que también se han encontrado variantes antigénicas en una población viral aislada de las glándulas salivales de un cricétido crónicamente infectado. Este hallazgo juntamente con las diferencias de los títulos de anticuerpos de los sueros de los Calomys crónicos, cuando se los enfrentó a su propio virus o a la cuna parental con un pasaje por cerebro de Calomys neonato, permite confirmar que la aparición de variantes serológicas es un fenómeno que no depende del tipo de célula que el virus infecta, y que los resultados observados no se producen por un artefacto causado por arrastre de algún determinado material presente en las membranas celulares a través de las que el virus brota.

En consecuencia, la variación antigénica estaría regulada por la expresión genética viral, frente a un estímulo de selección natural.

Podemos concluir que la infección persistente se podría mantener por aparición dentro de la población viral de variantes serológicas, las que progresivamente reemplazarían a la población original, favorecidas por la presión inmunológica.

La variación antigénica mostrada por el virus Junín sería una ventaja adaptativa, que le permitiría evolucionar eludiendo el sistema inmune, y además al contaminar las excreciones de los animales portadores, le permitiría infectar a algún cricétido que habiendo tomado contacto anteriormente con el virus, hubiera desarrollado una respuesta inmune contra el virus parental. Pero esta última posibilidad, requeriría una variación antigénica de la mayor parte de los determinantes antígenicos de la glicoproteína.

Como corolario de esta sección, se puede plantear un interrogante acerca del uso de vacunas atenuadas para virus Junín, sin establecer previamente si el virus produce persistencia en el hombre.

6. CONCLUSIONES

Resulta evidente de la discusión precedente que el modelo experimental C.musculus-cepa atenuada XJ Cl₃ de virus Junín, puede proveer un modelo promisorio para el estudio de distintos aspectos de la patogenia viral e infecciones persistentes. Además el esclarecimiento de estos aspectos puede redundar en el establecimiento de formas de lucha efectivas contra el reservorio natural del virus Junín.

Algunas de las conclusiones más interesantes son las siguientes:

1) Todos los animales inoculados fueron sensibles a la infección demostrando que ellos no son resistentes naturalmente.

2) Los C. musculus neonatos inoculados por vía i.p. presentaron morbimortalidad variable en función de la edad del animal al momento de la inoculación, encontrando que los cricétidos mayores de 21 días son

totalmente resistentes a la infección por dicha vía.

3) Esta resistencia a la infección estaría asociada con la madurez inmunológica a través de una acción virucida efectiva por medio de macrófagos peritoneales.

Esta barrera inmunológica sería activada por un factor que se manifestaría 24 hs después de la inoculación, y cuya actividad cesaría o no estaría presente in vitro.

4) Los animales adultos que son resistentes a la infección por vía i.p., son susceptibles por vía i.n.. La inoculación por esta vía produjo también una infección aguda, aunque con menores porcentajes de morbimortalidad.

Los animales inoculados por cualquiera de las dos vías, pueden enfermar o no. Los cricétidos que enferman, presentan sintomatología neurológica y pueden morir a causa de meningoencefalitis severas. Los que se recuperan de la etapa aguda o los que la cursan sin presentar síntomas, pueden eliminar el virus del organismo, o estar persistentemente infectados. En ambos casos se detectan altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

6) Los animales crónicamente infectados sobreviven por más de 500 días (superando la esperanza de vida en la naturaleza, que es de 90 días), presentando altos títulos de virus en cerebro. Además en un bajo porcentaje de animales se detecta virus en glándulas salivales.

7) A diferencia de los preceptos clásicos que indicaban que los arenavirus establecían infecciones de tipo persistentes en sus huéspedes naturales sin producir lesiones, en este trabajo se ha demostrado

que los animales enferman y mueren, y aquellos que sobreviven persistentemente infectados, presentan en todos los casos encefalitis leves aún cuando no presentan síntomas clínicos.

8) Los estudios sobre los mecanismos de transmisión viral entre cricétidos, corroboraron la existencia de transmisión horizontal. Los intentos por demostrar transmisión vertical fueron negativos.

Los estudios sobre los factores que intervienen en el establecimiento o mantenimiento de la infección persistente demostraron que:

9) Las poblaciones virales obtenidas de los cerebros de C. musculinus crónicamente infectados presentan un enriquecimiento en variantes ts en función del tiempo. Por otro lado, se estableció que dichas variantes son estables, dado que no revierten al ser crecidas dos veces en cultivos de células Vero.

10) Por primera vez se ha informado de la existencia de variantes serológicas para el virus Junín. Se demostró que en las poblaciones virales persistentes en cerebro o glándulas salivales, se pueden detectar variantes serológicas que son pobremente neutralizadas por los anticuerpos presentes en el suero de los mismos animales en que se practicaron los aislamientos virales. Estas variantes serían uno de los factores que intervendrían en el mantenimiento de la persistencia, escapando de la vigilancia inmunológica. Además la existencia de dichas variantes explicaría la aparición de viremias fugaces en los mismos animales que presentan altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

11) Los estudios realizados para establecer la participación de partículas PI en el estado de infección persistente, fueron enmascarados por la existencia de una actividad interferente antiviral inespecífica en el cerebro del C. musculus.

Resultó imposible separar por métodos convencionales dicha actividad interferente de las posibles partículas PI. Este factor podría tener algún rol en la patogenia viral, aunque no fue establecido.

Se determinó únicamente, que actúa a nivel de la adsorción viral y que su efecto puede ser revertido por dilución de los materiales a ensayar.

12) Los intentos por demostrar la participación de interferón en la patogenia viral o defensa de la infección, no pudieron ser llevados a cabo, ya que los animales normales presentan al igual que los cricétidos infectados una producción basal de interferón que imposibilitó la realización de los experimentos.

La producción de interferón podría ser debida a algún patógeno presente en la colonia de C. musculus.



Dr. Celina de Cotto



Dra. CELINA DE COTTO
Prof. Titular de Biología
Fac. Ciencias Exactas
y Nat. U. B. A.

7. RESUMEN

Se caracterizó la infección aguda y persistente del C. musculus inoculado experimentalmente por distintas vías con la cepa atenuada XJ Cl₃ de virus Junín. La morbimortalidad fue dependiente de la edad de los animales y de las dosis inoculadas. La sintomatología clínica fue neurológica y las muertes debidas a severas meningoencefalitis. Los animales que no enfermaban, o se recuperaban de la etapa aguda limpiaban el virus del organismo o se presentaban persistentemente infectados. En ambos casos se detectaron altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

El reservorio de virus en el organismo de los animales crónicamente infectados fue exclusivamente el cerebro, y en un bajo porcentaje las glándulas salivales.

Los estudios sobre transmisión del virus entre cricétidos demostraron que la misma ocurre en forma horizontal, no pudiendo establecer la existencia de transmisión vertical.

Con el objeto de esclarecer el mecanismo de persistencia se estudiaron las alteraciones que sufre el virus durante la infección persistente. La caracterización de las poblaciones virales presentes en el cerebro de los C. musculus crónicamente infectados demostraron: 1) Las poblaciones virales se enriquecen en función del tiempo en variantes ts. 2) Se detectaron en las mismas poblaciones la aparición de mutantes serológicas, que son pobremente neutralizadas por los anticuerpos neutralizantes presentes en los sueros de los mismos animales.

Además se detectó la presencia de un factor interferente antiviral inespecífico que podría tener algún papel en la patogenia viral.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alché, L.; Coto, C. Detección de variantes serológicas por cinéticas de neutralización en sangre de Calomys musculinus inoculados con virus Junín. Libro de resúmenes del Primer Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires agosto 1983. pag. 58.
- 2.- Avila, M.; Galassi, N.; Weissenbacher, M. Argentine Hemorrhagic Fever: a biologic marker. Intervirolog. 15:97-99, 1981.
- 3.- Bendinelli, M.; Nardini, L.; Campa, M. Neutralization of Friend leukemia virus by sera of unimmunized animals. J. Gen. Virol. 22: 207, 1974
- 4.- Berger, R.E.; Ainsbender, E.; Hodes, H.L.; Zepp, H.D.; Hevizy M.M. Demonstration of IgA polio antibody in saliva, duodenal fluid and urine.
- 5.- Burnet, F.M. and Fenner, F. The production of antibodies, 2nd ed. (Macmillan, Melbourne 1949).
- 6.- Casals, J. and Buckley S.M. Lassa Fever Virus. Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenavirus. Ed. F. Lehmann-Grube. Springer-Verlag. Berlín. Heidelberg. New York. pag 325-339, 1973.

- 7.- Coto, C.E.; Damonte, E.B.; Help, G.I.; León, M.E. Infección crónica in vitro con virus Junín. Medicina (Bs.As.) 37, supl. 3:39-45, 1977.
- 8.- Coto, C.E.; León, M.E.; Martínez Peralta, L.; Help, G.I.; Laguens R. P. Induction of infectious virus and viral surface antigen in Vero cells persistently infected with Junin virus. En Humoral Immunity in neurological diseases (Eds. D. Karcher, A. Lowenthal, A.D. Strosberg) Plenum, N. York. pag. 405-415, 1979.
- 9.- Coto, C.E.; Zaharzewskij, L.; Parodi, A.S. Localización sub-celular del virus Junín en el cerebro de ratón lactante. Estudio de infectividad. Rev. Soc. Arg. Biol. 41: 128-134, 1965.
- 10.- Coulombie, F. Comuniación personal.
- 11.- D'Aiutolo, A.C.; Cutrera, R.A.; Coto, C.E. Estudios morfométricos y citogenéticos de una colonia de Calomys musculinus. Reunión de la Soc. Arg. de Virología. La Plata, 1981.
- 12.- Damonte, E.B.; Coto, C.E. Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con los virus Junín y Tacaribe. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 6: 15-22, 1974.
- 13.- Damonte, E.B.; Coto, C.E. Temperature sensitivity of the arenavirus Junin isolated from persistently infected Vero cells. Intervirolog 11: 282-287, 1979.

- 14.- Garay, R.P.; Parodi, A.S. Presencia de un factor inhibidor del virus Junín en el cerebro del ratón adulto normal. Medicina (Bs.As.) 30, supl.1: 67-76, 1970.
- 15.- González, P.; Laguens, R.; Frigerio, M.; Calello, M.; Weissenbacher, M. Junin virus infection of Callithrix jacchus: Pathological features. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32 (2) : 417-423, 1983.
- 16.- González, P.H.; Lampuri, J.S.; Coto, C.E.; Laguens, R.P. In vitro infection of murine macrophages with Junin virus. Inf.and Immunity 35: 356-358, 1982.
- 17.- Guerrero, L.; Avila, M.; Milani, H.; Ruggiero, H.; Weissenbacher, M. Prevalencia de infección subclínica por virus Junín en una población seleccionada del área endémica de FHA. Medicina (Bs.As.) 42: 110-111, 1982.
- 18.- Guerrero, L.B.; de; Weissenbacher, M.C.; Parodi, A.S. Immunización contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con una cepa atenuada del virus Junín. I: Estudio de una cepa modificada del virus Junín. Medicina (Bs.As.) 29: 1-5, 1968.
- 19.- Hannover Larsen J. Murine LCM Virus Infection: Tolerance and Immunity. In Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenavirus. Ed. F. Lehmann-Grube. Springer-Verlag. Berlin.Heidelberg.N. York. pag 139-150 1973.

- 20.- Haspel, M.V.; Duff, R.; Rapp, F. Experimental measles encephalitis: a genetic analysis. *Inf. and Immun.* 12:785-790, 1975.
- 21.- Help, G.I. Biogénesis de partículas interferentes y su posible rol en las infecciones por virus Junín. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. 1980
- 22.- Help, G.I.; Coto, C.E. Propiedades de las partículas interferentes generadas por el virus Junín en células Vero. *Medicina (Bs.As.)* 41: 19-24, 1981.
- 23.- Help, G.I.; León, M.E.; Coto, C.E. Interferencia asociada a cultivos celulares crónicamente infectados con virus Junín. *Rev. Asoc. Arg. Microbiol.* 8:45-43, 1976.
- 24.- Hirsch, M.S.; Allison, A.C.; Harvey, J.J. Immune complexes in mice infected neonatally with Moloney leukemogenic and murine sarcoma viruses. *Nature, Lond.* 223: 739, 1969
- 25.- Hirsch, M.S.; Zisman, B.; Allison, A.C. Macrophages and age-dependent resistance to Herpes simplex virus in mice. *J. of Immunol.* 104:1160-1165, 1970.
- 26.- Holland J.I.; Spindler K.; Horodyski, F.; Grabau, E.; Nichol, S.; Van-de Pol, S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215: 1577-1585, 1982.

- 27.- Holstein, B.A. de; Teyssié, A.R.; Knecher, L.M. Producción de interferón por distintas cepas de virus Junín. *Medicina (Bs.As.)* 35: 587, 1975.
- 28.- Holtermann, O.A.; Majde, A.J. Histocompatibility and Lymphocytic Choriomeningitis virus infection. In *Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenavirus*. Ed. F. Lehmann-Grube. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. pag 73-81, 1973.
- 29.- Hotchin, J. The biology of Lymphocytic Choriomeningitis infection. *Virus-induced immune disease. Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol* 27: 479-499, 1962.
- 30.- Hotchin, J. Cyclical transient infection, an explanation of persistent virus infection. In *Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenavirus*. Ed. F. Lehmann-Grube. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. pag.85-100, 1973.
- 31.- Hotchin, J.E.; Cinits, M. Lymphocytic Choriomeningitis infection of mice as a model for the study of latent virus infection. *Cand. J. Microbiol.* 4:149-163, 1958.
- 32.- Hotchin, J.; Collins, D.N. Glomerulonephritis and late onset disease of mice following neonatal virus infection. *Nature, Lond.* 203:1357-1359, 1964.

- 33.- Hudson, J.B. The murine Cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. Arch. of Virol. 62: 1-29, 1979.
- 34.-Johnson, K.M.; Webb, P.; Justines G. Biology of Tacaribe-Complex Viruses. In Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenavirus. Ed. F. Lehmann-Grube. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. pag. 241-258, 1973.
- 35.- Kono, Y.; Kobayashi, K.; Funkunaga, Y. Antigenic drift of equine infection anemia virus in chronically infected horses. Arch. Gesamte Virusforsch. 41:1-10, 1973.
- 36.- Kravetz, F.O.; Busch, M.; Percich, R.E. Densidad de reservorios del virus Junín en campos de cultivo. Resumen Reunión Científica Anual de la Soc. Arg. de Virología. pag: 28, 1981.
- 37.- Kumar, S.; Baron, S. Non-interferon cellular products capable of virus inhibition. Texas Reports on Biology and Medicine. 41:82, 1981.
- 38.- Laguens, M.; Avila, M.; Samoilovich, S.; Weissenbacher, M.; Laguens, R. Pathogenicity of an attenuated strain (XJ Cl₃) of Junin virus. Intervirolog., in press, 1983.

- 39.- Lampert, P.W.; Joseph, B.S.; Oldstone, M.B.A. Antibody-induced capping of measles virus antigens on plasma membrane studied by electron microscopy. *J. Virol.* 15:1248-1255, 1975.
- 40.- Lehmann-Grube, F.; Lohler, J. Immunopathologic alterations of lymphatic tissues of mice infected with Lymphocytic Choriomeningitis virus. II: Pathogenetic mechanism. *Lab. Invest.* 44:205-213, 1983.
- 41.- Lohler, J.; Lehmann-Grube, F. Immunopathologic alterations of lymphatic tissues of mice infected with Lymphocytic Choriomeningitis virus. I: Histopathologic findings. *Lab. Invest.* 44: 193-204, 1981.
- 42.- Maiztegui, J.I.; Sabattini, M.S. Extensión progresiva del área endémica del Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (Bs.As.)* 37:supl. 3: 162-166, 1977.
- 43.- Martínez Peralta, L.; Cossio, P.M.; Sabattini, M.S.; Maiztegui, J.I.; Arana, R.M.; Laguens, R.P. Ultraestructural, immunohistochemical and virological studies in organs of Calomys musculinus infected with Junin virus by natural routes. *Medicina (Bs.As.)* 39:213-217, 1979.
- 44.- Martínez Peralta, L.; Laguens, R.P.; Cossio, P.M.; Sabattini, M.S.; Maiztegui, J.I.; Arana, R.M. Presence of viral particles in the salivary gland of Calomys musculinus infected with Junin virus by a natural route. *Intervirolog.* 11: 111-116, 1979.

- 45.- Mellors, R.C.; Aoki, T.; Huebner, R.J. Further implication of murine leukemia-like virus in the disorders of N2B mice. *J.Exp.Med.* 129:1045-1062, 1969.
- 46.- Mims, C.A. Aspects of the pathogenesis of virus disease . *Bacteriol. Rev.* 28:30-71, 1964.
- 47.- Mims, C.A. Factors in the mechanism of persistence of viral infections. *Prog. Med. Virol.* 18:1, (1974)
- 48.- Mims, C.A. Acute and Chronic LCM disease. *Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenavirus.* Ed. F. Lehmann-Grube. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New. York. pag. 167-174, 1973.
- 49.- Mims, C.A.; Wainwright, S. The immunodepressive action of Lymphocytic Choriomeningitis virus in mice. *J. Immunol.* 101:717-724, 1968.
- 50.- Monjan, A.; Bohl, L.; Hudgens, G. Neurobiology of LCM virus infection in rodents. *Bull WHO* 52:487-492, 1975.
- 51.- Murphy, F.; Winn, C.; Walker, D.; Flenister, R.; Whitfields, M. Early lymphoreticular viral tropism and antigen persistence. Tamiami virus infection in the cotton rat. *Lab. Invest.* 34:125-139, 1976.

- 52.- Narayan, O.; Griffin, D.E.; Chase, J. Antigenic shift of Visna virus in persistently infected sheep. *Science* 197:376-378, 1977.
- 53.- Narayan, O.; Griffin, D.E.; Clements, E.J. Virus mutation during "slow infection": Temporal development and characterization of mutants of Visna virus recovered from sheep. *J.Gen.Virol.* 41:343-352, 1978.
- 54.- Notkins, A.L.; Mahar, S.; Scheele, C.; Goffman, J. Infectious virus-antibody complex in the blood of chronically infected mice. *J.Exp.Med.* 124:81-97, 1966.
- 55.- Notkins, A.L.; Mergenhagen, S.E.; Howard, R.J. Effect of virus infections on the function of the immune system. *Annu. Rev. Microbiol.* 24: 525-538, 1970.
- 56.- Oldstone, M.B.A.; Dixon, F.J. Immune complex disease in chronic viral infections. *J.Exp Med.* 134:32, 1971.
- 57.- Oldstone, M.B.A. Virus neutralization and virus-induced immune complex disease: Virus-antibody union resulting in immunoprotection or immunologic injury. Two different sides of the same coin. In *Progress in Medical Virology*. Ed. J.L. Melnick. Karger-Basel. 19:84-119, 1975.
- 58.- Oldstone, M.B.A. Immune responses, immune tolerance and viruses.

Comprehensive Virology Vol. 15 "Virus-Host Interactions". Ed. Heinz Fraenkel-Conrat and Robert R. Wagner. pag 1-36, 1979.

- 59.- Parodi, A.S.; De La Barrera, J.M.; Rugiero, H.R.; Greenway, D.J.; Yerga, M.; Mettler, N.E.; Boxaca, M; Frigerio, M.J. Los reservorios del virus de la fiebre hemorrágica epidémica de la Provincia de Buenos Aires. Prensa Méd. Arg. 46:554-556, 1959.
- 60.- Parodi, A.S.; Greenway, D.J.; Rugiero, H.R.; Rivero, E.; Frigerio, M.J.; Mettler, N.E.; Garzon, F.; Boxaca, M.; Guerrero, L.B.de; Nota, N.R. Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. Día Médico 30: 2300-2302, 1958.
- 61.- Parodi, A.S.; Rugiero, H.R.; Greenway, D.J.; Mettler, N.E.; Martínez, A.; Boxaca, M.; De La Barrera, J.M. Aislamiento del virus Junín (FHA) de los ácaros de la zona endémica (Echinolaelaps echidninus, Berlese). Prensa Méd. Arg. 46:2242-2244, 1959.
- 62.- Pfau, C.J.; Welsh, R.M.; Trowbridge, R.S. Plaque assays and current concepts of regulation in arenavirus infections. In Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenavirus. Ed. F. Lehmann-Grube. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York pag101-111, 1973.
- 63.- Pinheiro F.P.; Shope, R.E; Andrade, A.H.P. de; Bensabeth, G.; Cacios, G.V.; Casals, J. Amaparí, a new virus of the Tacaribe group from ro-

- dents and mites of Amapá territory, Brazil. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 122: 531-535, 1966.
- 64.- Pirotsky, I.; Zuccarini, J.; Molinelli, E.A.; Di Pietro, A. Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense; endemo-epidémica, febril, enantemática y leucopénica. II: Recuperación del virus causal a partir de ácaros (Mesostigmata) capturados (1958) en la zona epidémica. Orientación Médica 8: 156-158, 1959.
- 65.- Pirotsky, I.; Zuccarini, J.; Molinelli, E.A.; Di Pietro, A.; Barrera Oro, J.G., Martini, P.; Copello, A.R. Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense; endemo-epidémica, febril, enantemática y leucopénica. Inst. Nac. Microb. Buenos Aires, Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública, 197 p., 1959.
- 66.- Popescu, M.; Lehmann-Grube, F. Diversity of Lymphocytic Choriomeningitis Virus: Variation due to replication of the virus in the mouse. J.Gen. Virol. 30: 113-122, 1976.
- 67.- Popescu, M.; Lohler, J.; Lehmann-Grube, F. Infectious lymphocytes in LCM virus carrier mice. J.Gen.Virol. 42:481-492, 1979.
- 68.- Porter, D.D.; Larson, A.E.; Porter, H.G.. The pathogenesis of Aleutian disease of mink. I: In vivo viral replication and host antibody response to viral antigen. J. exp. Med. 130: 575-593, 1969.

- 69.- Rabinowitz, S.G.; Dal Canto, M.C.; Johnson, T.C. Comparison of the central nervous system disease produced by wild-type and temperature sensitive mutants of Vesicular Stomatitis virus. *Infect.Immun.* 13: 1242-1249, 1976.
- 70.- Rabinowitz, S.G.; Johnson, T.C.; Dal Canto, M.C. The uncoupled relationship between the temperature- sensitivity and neurovirulence in mice of mutants of Vesicular Stomatitis virus. *J.Gen Virol.* 35: 237-250, 1977.
- 71.- Reed, L.J.; Muench, H.A. A simple method of estimating 50 % end points. *Ann. J.Hyg.* 27: 493-497, 1938.
- 72.- Richmond, J.Y. Evidence for a mouse pathogenicity locus in certain temperature-sensitive mutants of foot-and-mouth disease virus. *Infect. Immun.* 16: 827-831, 1977.
- 73.- Roberts, J.A. Growth of virulent and attenuated ectromelia virus in cultured macrophages from normal and ectromelia immune mice. *J.Immunol.* 92: 837-842, 1964.
- 74.- Rowe, W.P. Studies on pathogenesis and immunity in lymphocytic choriomeningitis infection of the mouse- Research report NM 005 048.14.01 (Naval Medical Research Institute, Bethesda, Md, 1954), citado por Cole, G. and Nathanson N. Lymphocytic Choriomeningitis . *Progr. Med. Virol.* vol 18 pag 94-110 (Karger, Basel), 1974

- 75.- Sabattini, M.S.; Virus Junín en la Provincia de Córdoba. Comisión Nac. Coordinadora para estudio y lucha contra la Fiebre Hemorrágica Argentina, Bs.As. 85-102, 1966
- 76.- Sabattini, M.S.; González del Río, L.; Diaz, G.; Vega, V.R. Infección natural y experimental de roedores con virus Junín. Medicina (Bs.As.) 37 supl 3: 149-161, 1977.
- 77.- Sabin, A.B.; Fieldsteel, A.H. Antipoliomyelitis activity of human and bovine, calostrum and milk. Pediatrics 29: 105-109, 1962.
- 78.- Silverstein, S. Macrophages and viral immunity. Semin. Hematol. 7: 185-214, 1970.
- 79.- Speel, L.F.; Osborn, J.E.; Walker, D.L. An immunocyto-phatogenic interaction between sensitized leucocytes and epithelial cells carrying a persistent non-cytocidal myxovirus infection. J. Immunol. 101: 409-417, 1968.
- 80.- Stanners, C.P.; Golberg, V.J. On the mechanism of neurotropism of Vesicular Stomatitis virus in newborn hamsters. Studies with temperature-sensitive mutants. J.Gen.Virol. 29: 281-296, 1975.
- 81.- Streissle, G. Persistent viral infections as models for research in virus chemotherapy. Achv. virus Res. 26: 37, 1981.

- 82.- Stroop, W.G.; Baringer, J.R. Persistent slow and latent viral infections. Ed. Melnick, J.L. Progr. Med. Virol. 28: 1-43, 1982.
- 83.- Teyssié, A.R.; Knecher, L.M.; Holstein, B.A. de. Interferón en la infección experimental con virus Junín. Medicina (Bs.As.) 41: 573-578, 1981.
- 84.- Trapido, H.; Sanmartin, C. Pichinde Virus - A new virus of the Tacaribe group from Colombia. Am.J.Trop.Med.Hyg. 20: 631-641, 1971.
- 85.- Traub, E. LCM virus research, retrospect and prospect. In Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenavirus. Ed. F. Lehmann-Grube. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. pag 3-10, 1973.
- 86.- Unanue, E.R.; Askonas, B.A. Persistence of immunogenicity of antigen after uptake by macrophages. J.Exp.Med. 127: 915-926, 1968.
- 87.- Vanella, J.M. Epidemiología de la FHA. Semana Médica 125:1502-1508,1964.
- 88.- Vickerman, K. Antigenic variation in African trypanosomes. In Parasites in the Immunized Host: Mechanism of survival. Ciba Foundation Symposium, vol 25 pag 53-80. Amsterdam: Associated Scientific Publishers.

- 89.- Vidal, M.del C.; Coto, C.E. Infección persistente de células de ratón con virus Junín: Participación del interferón. Medicina (Bs.As.) 40: 537-542, 1980.
- 90.- Wagner, R.R.; Snyder, R.M. Viral interference induced in mice by acute or persistent infection with the virus of lymphocytic choriomeningitis . Nature (Lond.) 196: 393-394, 1962.
- 91.- Walker, D.; Wulff, H.; Langer, J.; Murphy, F. Comparative pathology of Lassa virus infection in monkeys, guinea pigs and Mastomys natalensis. Bull WHO 52: 523-534, 1975.
- 92.- Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Hibbs, J.B.; Kuns, M.L. Parana, a new Tacaribe complex virus from Paraguay. Arch.Ges.Virus-forsch. 32: 379-388, 1970.
- 93.- Webb, P.A.; Johnson, K.M., Peters, C.J.; Justines, G. Behavior of Machupo and Latino viruses in Calomys callosus from two geographic areas of Bolivia. In Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenavirus. Ed. F. Lehmann-Grubbe. Springer-Verlag. Berlin.Heidelberg. New York. pag 313-324, 1973.
- 94.- Webb, P.A.; Justines, G.; Johnson, K.M. Infection of wild and laboratory animals with Machupo and Latino viruses. Bull WHO 52: 493-500, 1975.

- 95.- Weissenbacher, M.C. Infección subclínica con virus Junín: Ciencia e Investigación 33: 250-254, 1977.
- 96.- Weissenbacher, M.C.; Guerrero, L.B.de; Frigeriò, M.J. Infección subclínica, infección clínica y vacunación con virus Junín. Medicina (Bs.As.) 36: 1-8, 1976.
- 97.- Winn, W.C.; Murphy, F.A. Tamiami virus infection in mice and cotton rats. Bull: WHO 52: 501-506, 1975.
- 98.- Woodruff, J.F.; Woodruff, J.J. Prolonged allograft survival in Newcastle disease virus-treated mice. Infect. Immun. 9: 969-971, 1974. ;
- 99.- Wulff, H.; Melntosh, B.M.; Hammer, D.B. Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from Mastomys natalensis in south-east Africa. Bull WHO 55(4) 441-444, 1977. ;
- 100.- Younger, J.S.; Preble, O.T.; Jones, E.V. Persistent infection of L cells with VSV: Evolution of virus populations. J. Virol. 28(1): 6-13, 1978.
- 101.- Zisman, B.; Wheelock, E.F.; Allison, A.C. Role of macrophages and antibody in resistance of mice against Yellow Fever virus. J.of Immunol. 107: 236-243, 1971.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100