

Tesis de Posgrado

Infección experimental de la rata con virus Junín

Blejer, Jorgelina Luisa

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:

Blejer, Jorgelina Luisa. (1985). Infección experimental de la rata con virus Junín. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1935_Blejer.pdf

Cita tipo Chicago:

Blejer, Jorgelina Luisa. "Infección experimental de la rata con virus Junín". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1935_Blejer.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"INFECCION EXPERIMENTAL DE LA RATA
CON VIRUS JUNIN"

AUTOR: Lic. Jorgelina Luisa Blejer

DIRECTOR: Dra. Marta Rosa Nejamkis

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, U.B.A.

Tesis presentada para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1 9 8 5

1935
(2)





A MI ESPOSO,
A MIS PADRES.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Rosa Nejamkis, por su constante apoyo, actitud crítica y estímulo, que hicieron posible este trabajo.

Al Dr. Julio Azcurra, consejero de la Carrera del Doctorado.

A la Dra. María I. Berría, por su valiosa colaboración y opinión crítica.

Al Dr. Marcelo J. Frigerio, Profesor Titular de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, UBA, donde se realizó este trabajo.

A mis compañeros y al personal de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, UBA.

A la Srta. Alcira Dussaut, por su cooperación en la preparación del manuscrito.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCION.....	2
1.1. CARACTERISTICAS DEL VIRUS JUNIN.....	4
1.2. HUESPEDES EXPERIMENTALES.....	7
1.2.1. Modelo cobayo.....	7
1.2.2. Modelo ratón.....	9
1.2.3. Modelo primate.....	10
1.2.4. Modelo rata.....	12
1.3. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA DEL HUESPED A LAS INFECCIONES VIRALES.....	19
1.3.1. Respuesta humoral.....	20
1.3.2. Inmunidad mediada por células.....	22
1.3.3. Función del macrófago en las infecciones virales.....	24
1.4. VIAS DE ACCESO DE LOS VIRUS AL SNC.....	31
1.4.1. Vía neural.....	31
1.4.2. Vía olfatoria.....	31
1.4.3. Vía hemática.....	31
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIALES Y METODOS.....	39
3.1. ANIMALES.....	39
3.1.1. Ratas.....	39

3.1.2. Ratones.....	39
3.1.3. Carnero.....	40
3.2. VIRUS JUNIN (VJ).....	40
3.2.1. Cepa prototipo XJ (VXJ).....	40
3.2.2. Cepa XJC13 (VXJC13).....	40
3.3. PREPARACION DE LAS SUSPENSIONES DE VIRUS.....	40
3.4. CULTIVO DE TEJIDOS.....	41
3.4.1. Medios de cultivo y soluciones.....	41
3.5. PROCESAMIENTO DE LOS ORGANOS PARA AISLAMIENTO VIRAL.....	42
3.6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO.....	42
3.7. DETECCION DE VIRUS EN ORGANOS.....	43
3.7.1. Unidades formadoras de placas (UFP).....	43
3.7.2. Técnica de Co-cultivo.....	44
3.7.3. Inmunofluorescencia.....	46
3.8. DETECCION DE INMUNOCOMPLEJOS.....	46
3.9. VALORACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS.....	47
3.9.1. Titulación de anticuerpos neutralizantes (Ac Nt).....	47
3.9.2. Titulación de anticuerpos fijadores de complemento (Ac Fc).....	47
3.9.2.1. Obtención del antígeno.....	47
3.9.2.2. Técnica de fijación de complemento.....	48
3.9.3. Titulación de anticuerpos inmunofluorescentes (Ac IF).....	49

3.9.3.1. Monocapas de células infectadas.....	49
3.9.3.2. Determinación del título de Ac IF.....	49
3.10. ESTUDIOS DE ANATOMIA PATOLOGICA.....	49
3.11. ESTUDIOS REALIZADOS CON CELULAS PERITONEALES Y MA- CROFAGICAS.....	50
3.11.1. Obtención de células peritoneales.....	50
3.11.2. Purificación de macrófagos a partir de células de exudado peritoneal.....	50
3.11.3. Determinación de la capacidad macrofágica "in vitro".....	52
3.11.3.1. Medida de la capacidad fagocitaria de los ele- mentos sanguíneos.....	52
3.11.3.2. Medida de la capacidad fagocitaria de las célu- las de exudado peritoneal.....	53
3.11.4. Replicación del virus en los macrófagos.....	54
3.11.4.1. Determinación de centros infecciosos.....	54
3.11.4.2. Inmunofluorescencia.....	54
3.11.5. Tratamiento con Sílica (Si).....	55
3.12. OBTENCION DE INMUNOSUERO (IS) ANTI-VIRUS JUNIN.....	55
3.13. ESQUEMAS EXPERIMENTALES.....	55
3.14. ESTUDIOS ESTADISTICOS.....	55
3.15. GRADOS CLINICOS DE ENFERMEDAD.....	55
4. RESULTADOS.....	57

4.1. VARIACION DE LA SENSIBILIDAD CON LA EDAD DE RATAS INFECTADAS CON VJ.....	57
4.1.1. Sensibilidad de ratas infectadas con VXJ.....	57
4.1.2. Sensibilidad de ratas infectadas con VXJCl3.....	62
4.2. DESCRIPCION DE LOS SIGNOS CLINICOS OBSERVADOS EN RATAS DE 2 DIAS INFECTADAS CON AMBAS CEPAS DE VJ....	65
4.3. VARIACION DE LA SENSIBILIDAD DE RATAS DE 2 DIAS INFECTADAS CON DIFERENTES DOSIS DE VJ.....	67
4.3.1. Sensibilidad de ratas infectadas con VXJ.....	67
4.3.2. Sensibilidad de ratas infectadas con VXJCl3.....	67
4.4. AISLAMIENTO DE VIRUS.....	71
4.4.1. Titulación de virus por Unidades Formadoras de Placas (UFP).....	71
4.4.1.1. VXJ.....	71
4.4.1.2. VXJCl3.....	73
4.4.2. Aislamiento de virus por la técnica de co-cultivo.	73
4.4.2.1. VXJ.....	75
4.4.2.2. VXJCl3.....	75
4.4.3. Detección de antígeno viral por inmunofluorescencia.....	78
4.4.3.1. VXJ.....	78
4.4.3.2. VXJCl3.....	78
4.5. TITULACION DE ANTICUERPOS.....	81

4.5.1. Anticuerpos neutralizantes (Ac Nt).....	81
4.5.1.1. VXJ.....	81
4.5.1.2. VXJCl3.....	81
4.5.2. Anticuerpos fijadores de complemento (Ac Fc).....	83
4.5.2.1. VXJ.....	83
4.5.2.2. VXJCl3.....	83
4.5.3. Anticuerpos inmunofluorescentes (Ac IF).....	83
4.5.3.1. VXJ.....	83
4.5.3.2. VXJCl3.....	85
4.6. TITULO DE Ac Nt EN RATAS DE DIFERENTES EDADES INOCU- LADAS CON VXJ.....	85
4.7. DETECCION DE INMUNOCOMPLEJOS.....	85
4.8. ESTUDIOS DE ANATOMIA PATOLOGICA.....	85
4.9. SENSIBILIDAD DE LA CEPA DE RATA ENDOCRIADA BUFFALO/ SIM AL VJ.....	88
4.10. ESTUDIOS REALIZADOS CON CELULAS MACROFAGICAS.....	91
4.10.1. Obtención de células adherentes a partir de exu- dado peritoneal.....	91
4.10.2. Determinación de la capacidad macrofágica "in vitro" utilizando <u>Staphylococcus aureus</u>	94
4.10.2.1. Medida de la capacidad fagocitaria de los ele- mentos sanguíneos.....	94

4.10.2.2. Medida de la capacidad fagocitaria de las células peritoneales.....	96
4.10.3. Replicación del virus en los macrófagos.....	96
4.10.3.1. Determinación de centros infecciosos.....	96
4.10.3.2. Detección de antígeno viral por inmunofluorescencia.....	97
4.10.4. Tratamiento con Si.....	97
4.10.5. Transferencia pasiva de macrófagos.....	103
4.10.6. Transferencia de células de exudado peritoneal de animales infectados.....	105
4.11. TRANSFERENCIA PASIVA DE IS.....	106
4.12. ESTUDIOS DE PROTECCION CRUZADA ENTRE LAS CEPAS DE VJ.....	107
5. DISCUSION.....	112
6. CONCLUSIONES.....	139
BIBLIOGRAFIA.....	145

ABREVIATURAS

Ac Fc: Anticuerpos fijadores de complemento
Ac IF: Anticuerpos inmunofluorescentes
Ac Nt: Anticuerpos neutralizantes
CF: Ciclofosfamida
CMV: Citomegalovirus murino
FHA: Fiebre Hemorrágica Argentina
HSV: Virus del Herpes Simplex
HSV-1: Virus del Herpes Simplex, tipo 1
HSV-2: Virus del Herpes Simplex, tipo 2
ic: Intracerebral
im: Intramuscular
ip: Intraperitoneal
IS: Inmunosuero
LCM: Virus de la coriomeningitis linfocitaria
MEM: Minimal essential medium
MHV: Virus de hepatitis murino
pi: Postinfección
SAT: Suero antitimocito
SF: Solución fisiológica
Si: Sílica
SNC: Sistema Nervioso Central
UFP: Unidades formadoras de placas
VJ: Virus Junín
VXJ: Cepa XJ del virus Junín
VXJCl3: Cepa XJCl3 del virus Junín

1. INTRODUCCION

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), cuyo agente etiológico es el virus Junín, es una enfermedad endemoepidémica que apareció en la década del 50 en la zona Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

En 1958 se logró establecer el origen viral de la enfermedad mediante la recuperación del agente causal (1) (2) y su posterior caracterización (3). La FHA se ha extendido al Sur de Córdoba, Sur de Santa Fe y Este de La Pampa (4) (5). Resultan afectados, preferentemente, los trabajadores rurales durante los períodos de recolección de las cosechas de maíz y otros cultivos. Es más frecuente en los hombres entre 20 y 40 años, ya que son los más expuestos a contraer la enfermedad por razones ocupacionales.

El cuadro clínico se caracteriza por un síndrome febril con alteraciones hematológicas, cardiovasculares, digestivas, renales y neurológicas, registrándose una amplia variación en la severidad de la afección, la mayoría de los pacientes se recuperan de la infección, pero en algunos casos la enfermedad sigue un curso fatal.

Epidemiológicamente, la FHA es considerada una zoonosis vinculada a reservorios representados por roedores silvestres, particularmente del género Calomys, abundantes en los campos

de la llanura pampeana, en los cuales el virus Junín persis
te a lo largo de sus vidas (6) (7) (8). El aumento de densi
dad de población de estos reservorios coincide con el ritmo
de aparición de casos de enfermedad humana.

1.1. CARACTERISTICAS DEL VIRUS JUNIN

El virus Junín (VJ) pertenece a la familia Arenaviridae (9) (10), cuyos componentes se caracterizan por presentar ARN de cadena simple, labilidad al éter y a otros solventes lipídicos y poseer dentro de la partícula viral un número considerable de gránulos semejantes a ribosomas, que son los responsables del aspecto arenoso que es característico del grupo (11) (12).

Producen infecciones persistentes tanto en reservorios naturales como en cultivos celulares. La infección del hombre por algunos miembros del grupo está asociada a enfermedades que pueden resultar fatales.

El prototipo del grupo es el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM). Del resto de los constituyentes, tres son patógenos para el hombre: Junín, Machupo y Lassa, aislados en Argentina, Bolivia y Nigeria respectivamente.

El VJ forma parte del complejo Tacaribe, junto con los virus Amparí, Latino, Machupo, Paraná, Pichindé, Tacaribe y Tamiami, el cual está definido por las estrechas relaciones antigénicas y biológicas de sus miembros.

El VJ multiplica en el citoplasma de la célula infectada y emerge por brotación. Estudios de microscopía electrónica en cultivos primarios de fibroblastos de ratón (13) y de

riñón de hamster y de conejo (14) permitieron comprobar que el mismo se visualiza como una partícula pleomórfica, redondeada u oval, con un diámetro promedio de 110 - 130 nm pero con amplias variaciones individuales. Como características estructurales presenta una envoltura periférica de composición lipoproteica y estructura membranosa, una banda electrodensa y una zona central con los gránulos semejantes a ribosomas.

En cuanto a la composición química, se ha establecido que está constituido por ARN de cadena simple (15) y mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se confirmó que, a semejanza de otros virus pertenecientes al mismo grupo, el ARN está constituido por cuatro fracciones mayores y tres menores (16).

Trabajos realizados por Martínez Segovia y De Mitri (17) demostraron que posee además 6 polipéptidos, de los cuales 4 son glucopéptidos, cuyos pesos moleculares se han estimado en 91.000, 72.000, 52.000 y 38.000 daltons y son designados GP91, GP72, GP52 y GP38, respectivamente. Los dos polipéptidos restantes, P64 y P25, de pesos moleculares de 64.000 y 25.000, no contienen hidratos de carbono. Los autores suponen que P25 es un producto derivado del clivaje de una proteína mayor, ya que no se observa regularmente en todos los perfiles electroforéticos. P64 es la proteína estructural predominante en el

viri6n; permanece asociada al ARN luego del tratamiento con detergentes, con lo que demostr6 ser la nucleoproteína, es decir, la principal proteína asociada al ARN en la nucleocápside (17) (18). GP38 es una glicoproteína de envoltura, accesible a la extracci6n con detergentes. De las restantes glicoproteínas, se ha postulado que GP91 es un agregado de uno o más polipéptidos virales (19) y hay evidencias preliminares de que GP72 es un precursor que no se cliva completamente despu6s de la brotación (20). La localizaci6n de GP52 es desconocida hasta el presente.

Trabajos realizados por Grau y col. (18) no concuerdan completamente con los datos anteriores, ya que s6lo detectaron la proteína predominante de la nucleocápside y dos glicoproteínas de 39.000 y 44.000 de peso molecular. Estas diferencias pueden deberse a variaciones en el tiempo de cosecha del virus, marcado de proteínas y/o procedimientos de purificaci6n.

1.2. HUESPEDES EXPERIMENTALES

La utilización de animales de laboratorio inoculados con VJ, ha posibilitado acceder al estudio de los mecanismos responsables de su patología, aportando así una valiosa información que en muchos aspectos ha contribuido al me jo r conocimiento de la enfermedad humana.

1.2.1. Modelo cobayo

Los primeros ensayos utilizando al cobayo como huésped experimental (21) demostraron que el mismo es sensible a la cepa patógena XJ (VXJ) ya sea por inoculación intraperitoneal (ip), subcutánea, intramuscular (im), intracerebral (ic) y por escarificación cutánea, presentando en todos los casos una mortalidad del 100% entre los 10 y 18 días post-infección (pi). El cuadro hemorrágico es similar al observado en la en fer me da dad humana (22).

Los signos de enfermedad son hipertemia que se acentúa a medida que progresa la enfermedad, observándose en los es ta dios finales una marcada hipotermia, y una significativa pé r dida de peso. En la autopsia se encuentran signos característ i cos que definen el cuadro típico de la enfermedad, siendo ellos petequias en piel y en tejido celular subcutáneo; pete qui as y hemorragias en intestino grueso y delgado, en suprarren ales y en la mucosa bucal; adenopatías hemorrágicas y condenen

sación pulmonar (21) (22).

Los estudios hematológicos demuestran la existencia de una marcada leucopenia a expensas de los neutrófilos y acentuada plaquetopenia con una discreta anemia (23) (24) (22). La variación de los valores está en relación con el tiempo de inoculación.

En cuanto a la distribución del virus, se detectó una viremia temprana que persistió hasta la muerte de los animales y amplia replicación en la mayoría de los órganos (21) (22).

El cobayo resiste la infección con la cepa atenuada XJC13 (VXJC13), presentando muy baja mortalidad y pobre replicación viral (25) (26). Lo mismo se observó con la variante XJ0 de la cepa prototipo (27) (28).

Cuando el cobayo es inoculado con virus Tacaribe no enferma y la diseminación y replicación viral es muy limitada (29).

La inoculación de las cepas atenuadas del VJ (25) (26) (28) y del virus Tacaribe (29) (30) le confieren un 100% de protección contra un desafío con la cepa patógena.

La infección con VXJ provoca en el cobayo un apreciable grado de inmunosupresión, tanto de la respuesta primaria (31) como de la secundaria (32) hacia antígenos heterólogos, lo

que sería debido, en gran parte, a la desaparición de células inmunocompetentes (33). El mismo efecto fue observado sobre la hipersensibilidad tipo Jones Mote (34), en el fenómeno de Arthus (35) y en la reactividad tuberculínica (36). Por el contrario, con la cepa atenuada VXJCL3 (37) (38) (39), con la variante XJ0 (38) (39) y con el virus Tacaribe (40), no se observó inhibición de la respuesta inmunológica humoral y/o celular.

1.2.2. Modelo ratón

A diferencia del cobayo, el ratón albino lactante responde a la inoculación viral por vía ic con signos francamente neurológicos (41). La mortalidad alcanza el 90-100% entre los días 7 a 27 pi con un período crítico entre los 11 y 18 días pi (42). La infección por otras vías provoca efectos similares pero en menor proporción.

Fue aislado virus de cerebro a partir de las 48 horas pi, llegando a un máximo a los 7 días pi. En sangre fue detectado a los 4 días pi y más tardíamente en hígado. Los valores hematológicos no sufrieron variaciones hasta después del día 10 pi, momento en el cual se observó una leucopenia significativa (42).

Varios estudios experimentales demuestran que el cuadro encefalítico se debe a un mecanismo de hipersensibilidad mediada por células y no a una acción directa del virus. En ratones

timectomizados al nacer (43) (44) o en animales atímicos (45) la inoculación ic con VJ no provocó una encefalitis, pese a la multiplicación viral en cerebro. Por otra parte, ha sido comprobado el efecto protector de tratamientos inmunosupresores como el suero antitimocito (SAT) (46) (47) y la ciclofosfamida (CF) (48).

La encefalitis experimental del ratón es independiente de la virulencia de la cepa de virus utilizada (49).

El ratón adulto inoculado por vía ic con VJ no enferma y la mortalidad sólo alcanza el 5-10% (50). Los animales producen anticuerpos neutralizantes a partir de los 20 días pi, que se mantienen hasta los 7 meses pi. La viremia resulta negativa y no se aísla virus en cerebro más allá de los 10 días pi.

1.2.3. Modelo primate

Este huésped experimental fue utilizado ya que es filogenéticamente el más cercano al hombre.

Estudios realizados con monos Alouatta carayá (mono aullador) (51) (52), Saimiri sciureus (53) y Aotus trivirgatus (54) demostraron que la inoculación de VJ a estos animales no les produjo enfermedad, aunque indujo la producción de anticuerpos neutralizantes, por lo cual estos primates no pudieron ser utilizados como modelos experimentales extrapolables

a la enfermedad humana.

El Cebus sp en cambio, demostró ser sensible a la acción del VJ dependiendo de la vía de inoculación y de la cepa de virus utilizada (55). El 25% de los animales inoculados con VXJ por vía im presentaron un cuadro neurológico con plaquetopenia y moderada leucopenia con presencia de anticuerpos neutralizantes.

La inoculación de VXJC13 por vía ic produjo un 25% de mortalidad observándose en algunos casos un cuadro neurológico, plaquetopenia, leucopenia, descenso de peso y presencia de anticuerpos circulantes (55).

Estudios utilizando el marmoset Callithrix jacchus (56) (57) inoculados con VXJ por vía im demostraron que el mismo es susceptible a la infección viral, presentando un cuadro que se asemeja en muchos aspectos a la enfermedad humana. Los animales presentaron anorexia, pérdida de peso, trombocitopenia y leucopenia, viremia y multiplicación viral en órganos y síntomas neurológicos y/o hemorrágicos. La muerte se produjo alrededor del día 21 pi.

Tanto VXJC13 como el virus Tacaribe, no resultaron patógenos para estos animales y han permitido proteger a los mismos frente a un desafío con VXJ (58) (59).

1.2.4. Modelo rata

- Infección con VXJ: Estudios realizados por Nejamkis y col. (60) demostraron que la rata se comporta en forma diferente a los otros huéspedes experimentales cuando es infectada por vía ic con VXJ.

Los animales desarrollaron signos clínicos de enfermedad al ser infectados entre los 2 y 16 días de vida. Las crías de 2-3 días no presentaron mortalidad, siendo del 31% al ser inoculadas a los 5 días de edad. En los animales infectados a los 7 días de vida la mortalidad llegó al 91% y esta sensibilidad se mantuvo en las ratas de 10 y 12 días de edad. La mortalidad fue disminuyendo con la edad y a partir de los 19 días de vida los animales adquirieron resistencia a la infección.

En las ratas de 2 días de vida, la enfermedad se manifestó por una falta en el desarrollo del peso corporal y una ostensible disminución en el tamaño y en el peso de los cerebros. Además algunas ratas presentaron alteraciones en la marcha y el pelo ralo y opaco.

El virus multiplicó en el cerebro alcanzando títulos máximos entre los 4 y 10 días pi, disminuyendo paulatinamente hasta hacerse negativos a los 21 días pi; la viremia fue baja y los anticuerpos neutralizantes comenzaron a aparecer al

rededor del día 15 pi.

Cuando los animales fueron inoculados a los 10 días de edad, presentaron signos neurológicos bien manifiestos, con alteraciones en la marcha e hiperexcitación, agravándose el cuadro a medida que transcurrían los días, hasta llegar a observarse lateralización en la marcha, falta de equilibrio, temblores, contracturas y cianosis, produciéndose la muerte con un cuadro encefalítico.

La replicación viral en cerebro fue similar a la observada en el grupo de 2 días de edad. No se registró viremia ni anticuerpos circulantes ni alteraciones hematológicas con respecto a los controles sin infectar.

Las ratas de 28 días de edad no presentaron morbi-mortalidad; los títulos de virus en cerebro fueron menores que los obtenidos en las ratas inoculadas a los 2 y 10 días de vida y los anticuerpos neutralizantes fueron detectados después de los 12 días pi.

Estudios anatomopatológicos e inmunohistoquímicos (61) demostraron que la infección letal en ratas de 10 días de vida, estaba asociada con la presencia de antígeno viral en el citoplasma de la mayoría de las neuronas corticales, coincidentemente con una encefalitis de severidad progresiva que provocaba la destrucción de una gran parte del cerebro.

Por el contrario, en ninguna rata infectada a los 26 días de edad se observó lesión anatomopatológica y en las muestras examinadas por inmunofluorescencia entre los 5 y 10 días pi, se detectaron sólo escasas neuronas cerebrales positivas dispersas al azar.

En las ratas de 2 días de edad no se observó infiltrado inflamatorio del cerebro, presentando todos los animales una severa hipoplasia cerebelosa. Por medio de técnicas inmunohistoquímicas se halló antígeno viral en el citoplasma de las células granulosas del cerebelo y en escasas células de Purkinje. El estudio con microscopía electrónica mostró viriones en el intersticio de la capa granulosa. Estos hallazgos se observaron desde los 3 hasta los 180 días después de la infección, lo que sugiere la existencia de una infección persistente con atrofia cerebral a pesar de la presencia de anticuerpos neutralizantes. Esto representaría el primer ejemplo de una infección crónica no tolerante producida por un arenavirus patógeno para el hombre, en una especie diferente del reservorio natural.

- Infección con VXJCl3: La rata responde en forma diferente al ser infectada por vía ic con VXJCl3 (62), ya que los animales de 2 días de edad presentaron alrededor de un 95% de mortalidad, la cual se mantiene elevada en los grupos etarios

de 5; 8; 10 y 12 días, para disminuir al utilizar ratas de 16 días de vida. Cuando los animales fueron inoculados a los 26 días de edad, la mortalidad fue nula.

En las ratas de 2 días de vida se detectó multiplicación viral en cerebro desde el 3° día pi, alcanzando un pico máximo entre los 6 y 10 días pi. Los animales de 10 días presentaron una replicación viral similar; en cambio se registraron títulos bajos en los de 26 días.

Por la diferencia de comportamiento en la infección con VXJ y con VXJCl3, la rata de 2 días de edad puede ser utilizada como marcador de virulencia entre cepas patógenas y atenuadas del VJ.

Estudios anatomopatológicos indicaron que la mortalidad de casi el 100% de los animales de 2 y 10 días de edad infectados con VXJCl3 estaba asociada con la aparición de un intenso exudado inflamatorio con destrucción de amplias zonas del encéfalo. Por el contrario en los animales sobrevivientes a la infección, sólo se observó atrofia neuronal sin infiltración inflamatoria (63).

- Tratamiento con inmunosupresores: Cuando se utilizó CF como droga inmunosupresora en las ratas infectadas ic con VXJ a los 2 días de vida, la sobrevivencia disminuyó al 45%, manteniéndose en el 95% para los animales que recibían solamente

el virus (64). Sin embargo, la replicación viral en cerebro fue similar en ambos grupos. La respuesta de anticuerpos neutralizantes fue mínima en los animales tratados con la droga, mientras que en infectados no tratados alcanzaron un alto título. Estos datos sugieren que VXJ produce una infección subclínica, la cual es superada por los mecanismos inmunes del huésped. Cuando éstos son suprimidos por la CF, hay un mantenimiento de virus en cerebro y una carencia de anticuerpos neutralizantes que provocaría la muerte de los animales.

La encefalitis desencadenada en las ratas de 2 días de vida inoculadas ic con VXJCl3, que provoca un 95% de mortalidad, se revierte, en parte, cuando son tratadas con CF (64% de mortalidad), sin que existan diferencias en el título de virus en el cerebro de estos dos grupos. Esto estaría indicando que VXJCl3 produce en este grupo etario una inmunopatología similar a la que se describió en el ratón lactante infectado con VXJ, cuadro que también se logra superar por tratamientos con inmunosupresores (46) (48).

La acción letal que tienen ambas cepas sobre la rata de 10 días de edad no se vio modificada por la CF, lo que lleva a sugerir que hay una acción citopática directa del virus. La resistencia a la infección de las ratas de 26 días tampoco resultó alterada con la inmunosupresión (64).

Estudios inmunocitoquímicos (65) utilizando ratas de 2 días de edad indicaron que en los animales controles sin tratamiento con CF, aparecieron pequeños focos necróticos en la corteza cerebral al 5° día pi, los que se extendieron paulatinamente hasta alcanzar su máximo en el día 9 pi, cuando el 50% de los animales mostraron extensas áreas de necrosis. En el grupo tratado con CF, el área necrótica era menos extendida y en el día 9 pi sólo estaban afectadas el 15% de las ratas.

En los controles sin tratar, la marcación inmunocitoquímica mostró linfocitos T en meninges al 5° día pi, alcanzando su máximo en la corteza cerebral al 6° día pi, para ir luego disminuyendo hasta el día 9 pi. En estos animales fueron revelados cúmulos de macrófagos en meninges al 5° día pi y aumento paulatino de estas células en la corteza cerebral hasta alcanzar su máximo en el día 9 pi. En las ratas tratadas, los cambios fueron similares, aunque mucho más escasos en relación con la menor magnitud y frecuencia de la necrosis cerebral. Estos hallazgos confirman en forma directa la intervención del sistema inmune en la patología de la infección de la rata de 2 días de vida infectada por vía ic con VXJC13.

Ensayos utilizando SAT (66) fueron coincidentes con los resultados empleando CF.

- Tratamiento con inmunosuero: Es de interés señalar la importancia de la transferencia de suero inmune a ratas de 2 días infectadas con VXJCl3 (67). Los animales resultaron altamente protegidos (71% de sobrevivida) mediante la administración pasiva de anticuerpos, mientras que los títulos de virus en cerebro y las alteraciones histológicas no fueron afectadas por el tratamiento.

La administración de inmunosuero a ratas de 10 días de edad infectadas con VXJCl3 produjo una disminución en la morbimortalidad, retraso en el día promedio de muerte y disminución de la replicación de virus en el cerebro con respecto a los controles (68).

- Infección por vía ip: A la inversa de lo que sucede con la infección ic, la rata de 2 días de edad inoculada con VXJ por vía ip presenta una mortalidad de alrededor del 75%, en cambio con VXJCl3 sólo alcanza el 20% (62). Este modelo experimental es el estudiado en el presente trabajo.

1.3. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA DEL HUESPED A LAS INFECCIONES VIRALES

En las infecciones virales primarias, los factores no específicos de resistencia del huésped representan la principal línea de defensa durante los primeros días de la infección. Dichos elementos son las barreras contra la penetración viral (como el epitelio cutáneo, el epitelio respiratorio ciliado, el endotelio vascular, la pérdida de receptores en la membrana celular, etc.) (69), la producción de interferón (70), el cual también puede ser producido por macrófagos (71), la fagocitosis que conduce a la destrucción viral (72), la neutralización viral por complemento en ausencia de anticuerpos (73), la temperatura corporal alta, etc.

La recuperación de una infección establecida está dada por la respuesta inmune específica del huésped. La defensa inmunológica contra infecciones virales cumple dos funciones: eliminar la infección en curso y prevenir reinfecciones o por lo menos limitar sus consecuencias.

Para llevar a cabo los mecanismos de defensa, la respuesta inmune específica incluye la inmunidad humoral, o sea síntesis de anticuerpos con capacidad de neutralizar al virus extracelular, y la inmunidad celular, con el objeto de eliminar las células infectadas. Dichos mecanismos son efectivos

sólo si están dirigidos contra las estructuras externas de los virus, las cuales estimulan la producción de anticuerpos, así como la formación de varias poblaciones de linfocitos inmunes.

La naturaleza y tipo de respuesta inmune depende, en gran parte, de los tejidos linfoideos presentes en el sitio de la infección.

1.3.1. Respuesta humoral

La característica de la respuesta de anticuerpos hacia un agente viral está determinada generalmente por la puerta de entrada del virus y su habilidad de diseminarse hacia otros órganos en concentraciones adecuadas.

Durante una infección viral, las inmunoglobulinas pueden estar dirigidas contra blancos antigénicos en dos formas: o bien contra componentes de superficie del virión, o contra la membrana de la célula huésped que contenga proteínas codificadas por el virus.

Los anticuerpos adquiridos como resultado de una infección natural, o debido a una inmunización o por administración pasiva de gamaglobulina pueden jugar un papel muy importante en limitar las infecciones virales. Dicha importancia consiste en: a) eliminar la viremia previniendo la distribución del virus a los órganos blanco susceptibles y por ende evitar la expresión de la enfermedad (74); b) impedir la adsorción y pe

netración del virus a las células susceptibles (75), c) formar agregados de viriones reduciendo el número de partículas infecciosas (76), d) cubrir la superficie del virión y aumentar la fagocitosis (77). Además los anticuerpos logran neutralizar muchos virus en forma no destructiva, sin producir alteraciones permanentes en la morfología viral (78).

Por otra parte, como sucede con los complejos inmunes, los anticuerpos unidos a la superficie viral pueden activar el sistema complemento dando como resultado una amplificación de la neutralización. Dicha amplificación se debería a tres mecanismos: a) por inhibición de la capacidad del virus de unirse y/o penetrar en una célula susceptible (79), b) por inducir la aglutinación, llevando a una reducción en el número de partículas infecciosas (80), c) por lisis viral, siempre que el virus contenga envoltura lipídica, causando un daño estructural irreversible (81).

Es importante tener en cuenta que en algunas infecciones la transferencia pasiva de anticuerpos puede incrementar la sensibilidad hacia el virus como sucede en la infección de monos Rhesus con virus Dengue (82).

Los anticuerpos dirigidos contra estructuras virales internas no ofrecen ventajas al huésped, llegando muchas veces a producir daño, mediante la formación de complejos inmunes. Estos complejos, al interactuar con el sistema complemento pue

den depositarse en los tejidos e inducir inmunopatologías (83).

Las moléculas de inmunoglobulinas tienen varios efectos cuando se unen a antígenos virales sobre la superficie celular. Las mismas pueden llevar a la consolidación del antígeno en el mosaico fluido de la membrana celular, un fenómeno llamado "capping", el cual da lugar a la extrusión del antígeno de la superficie celular o facilita la endopinocitosis dentro de la célula. También intervienen bloqueando la citotoxicidad mediada por células T o funcionando como intermediarios en la destrucción de células infectadas por citotoxicidad mediada por complemento, por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos vía células "killer", macrófagos o células polimorfonucleares o promoviendo la fagocitosis celular por macrófagos armados o no.

1.3.2. Inmunidad mediada por células

El papel de la respuesta mediada por células es promover la recuperación de una infección viral eliminando o restringiendo las células infectadas con virus (84), ya sea por elaboración de productos celulares específicos capaces de estimular la supresión de los virus (linfoquinas) o por destrucción directa de las células. Estas células blanco incluyen las infectadas con virus con envoltura, las cuales han incorporado proteínas codificadas por el virus en la membrana citoplasmá

tica, o que tienen un genoma viral integrado cuya superficie celular presenta antígenos expresados por el virus o antígenos propios alterados (85).

Las células T citotóxicas tienen la capacidad de destruir una célula infectada por citotoxicidad directa sin participación de los anticuerpos. Las linfoquinas liberadas por las células T pueden sensibilizar nuevas células T, activar macrófagos, inhibir o aumentar la actividad de la célula B y modular así la respuesta inmune.

La capacidad de los linfocitos T sensibilizados de destruir células blanco "in vitro", pudo ser correlacionada con la eliminación de virus infeccioso "in vivo", sugiriendo una acción directa de estos linfocitos T en la recuperación (86) (87).

La supresión de la respuesta inmune mediada por células, por medio de la timectomía o del suero antitimocito ha incrementado la susceptibilidad de ciertos huéspedes experimentales a virus como ectromelia (88), herpes (89), Junín (44) (45) (66) entre otros, mientras que no ha tenido efecto con algunos enterovirus (90). Cuando ratones infectados con virus herpes fueron tratados con suero antilinfocito en un estadio temprano de la infección, previamente a la invasión del sistema nervioso central (SNC), la incidencia de infección en SNC y la mortalidad resultó incrementada. Cuando el suero antilinfocito fue

administrado una vez que el virus hubo invadido el SNC, el tiempo de muerte resultó retrasado (91), esto indicaría que la actividad de las células linfoides protegen contra una invasión del SNC, pero una vez que dicha invasión se ha producido su acción citotóxica acelera la enfermedad.

Los linfocitos T lisan a las células infectadas sólo si ambas comparten los antígenos K y D (moléculas clase I) del complejo mayor de histocompatibilidad (92). Probablemente la destrucción de las células blanco por linfocitos T ocurren durante la fase de eclipse del ciclo infeccioso.

Ha sido demostrado que los linfocitos T sensibilizados son los responsables de la encefalitis que se desencadena en determinados huéspedes experimentales, cuando el cerebro es el órgano blanco de la infección viral (44) (47) (93) (94) (66) (45) (65).

1.3.3. Función del macrófago en las infecciones virales

Los macrófagos juegan un papel crítico en la resistencia a muchas infecciones virales por vía periférica (95).

El término "macrófago" fue introducido por Metchnikoff en 1892 (96), quien clasificó a las células fagocíticas como "macrófagos" y "microfagos" (leucocitos polinucleares) basándose en aspectos morfológicos y funcionales.

Las propiedades funcionales de las células macrofágicas son: fagocitosis, pinocitosis y habilidad para adherirse a

superficies de plástico o vidrio (97).

La ingestión de partículas se incrementa cuando son recubiertas por anticuerpos específicos, con o sin complemento, porque las células macrofágicas poseen en su membrana celular receptores para el fragmento Fc (98) (77) de las inmunoglobulinas y para factores del complemento (99).

Los fagocitos mononucleares se originan a partir de células precursoras de la médula ósea donde maduran a promonocitos y monocitos. Los monocitos se transportan por vía sanguinea a órganos y tejidos donde continúa la maduración transformándose en macrófagos.

La propiedad que tienen estas células de ser capaces de responder al estímulo externo y adaptarse a su entorno, las hace únicas.

Las características de los macrófagos que los convierten en elementos tisulares reguladores son: a) actuar como células accesorias presentadoras de antígeno; b) liberar enzimas, factores de crecimiento y moléculas activas de bajo peso molecular; c) poseer receptores para responder a linfoquinas, con lo cual pueden desarrollar actividad citocida (100).

Por su presencia en el sitio donde se inicia una infección y su amplia distribución, en contacto con la sangre circulante en la mayoría de los órganos, los macrófagos resultan deci-

sivos en determinar la susceptibilidad o resistencia hacia infecciones virales (72). Por otra parte, la proliferación macrofágica puede ser inhibida por un agente viral, interfiriendo de esta manera con la resistencia del huésped (101).

Gran parte de la información sobre la importancia de los macrófagos en la resistencia a las infecciones virales pudo ser obtenida a través de estudios de infecciones experimentales utilizando: a) distintas cepas de virus, b) huéspedes de diferentes edades o c) distintas cepas animales de la misma especie.

a) La utilización de cepas virales patógenas y atenuadas, ha permitido reconocer marcadores de virulencia. En algunos casos, pudo correlacionarse la capacidad de una cepa viral de replicar en macrófagos con la susceptibilidad del animal a la infección, mientras que la propiedad de los macrófagos en restringir la replicación viral fue correlacionada con la resistencia del huésped.

Estudios realizados por Mogensen (102) infectando ratones con el virus del Herpes simplex (HSV), demostraron que la restricción por parte de los macrófagos peritoneales en la replicación del tipo 1 (HSV-1) fue mayor que para el tipo 2 (HSV-2). La inoculación ip con HSV-2 provoca hepatitis con progresivos focos de necrosis, mientras que con HSV-1, dichos focos son es

casos. Resultados similares obtuvieron Tosolini y Mims con LCM (103) quienes observaron que la cepa WE-3 que provoca una enfermedad aguda en el ratón albino adulto infecta al 70% de los macrófagos, mientras que sólo el 4% de estas células estaban infectadas con la cepa Armstrong, la cual es incapaz de establecer una infección. También ha podido establecerse una relación entre la virulencia de diferentes virus de hepatitis murinas (MHV) y su capacidad de crecer en células peritoneales adherentes (104).

b) Las infecciones virales son en general mucho más severas en el período perinatal. A nivel experimental, los mecanismos de resistencia relacionados con la edad, ocurren luego de una inoculación por vía periférica, mientras que tanto adultos como lactantes son susceptibles a una administración intracerebral (105). Esta diferencia en la susceptibilidad de los animales de laboratorio dependiente de la ruta de inoculación, ha llevado al concepto de la existencia de barreras que inhiben la distribución del virus hacia los órganos susceptibles. Dichas barreras estarían constituidas por macrófagos, cuya maduración tiene lugar durante las primeras semanas de vida.

Trabajos realizados por Argyris (106) en ratones lactantes, demostraron que la inmadurez inmunológica, es debida en

parte a la presencia de células supresoras en los neonatos. La administración de macrófagos de ratones adultos a lactantes dio origen a un aumento en el número de células formadoras de anticuerpos en estos últimos y disminuyó la actividad supresora de las células esplénicas. La transferencia de macrófagos controlaría la actividad de las células supresoras en los ratones lactantes y un incremento en el número de macrófagos poco después del nacimiento da lugar a una disminución en el número y/o función de las células supresoras, permitiendo una competencia inmunológica. Además Knoblich y col. (107) demostraron que la inhibición de los macrófagos murinos por el tratamiento con sílica provocó un aumento en la producción de anticuerpos hacia HSV, mientras que los sobrenadantes de cultivos de macrófagos redujeron significativamente los niveles de anticuerpos.

Es de destacar que los macrófagos de neonatos no expresan en su membrana moléculas Ia, siendo esta condición necesaria para la interacción con la célula T en presencia de antígeno (100). Además, la transferencia de macrófagos inmaduros a animales adultos, inhibe la expresión de Ia en estos últimos (108).

Luego de una inoculación periférica, los ratones infectados con virus HSV-2 desarrollan una resistencia a la encefalitis dependiente de la edad. Estudios efectuados por Hirsch y

col. (109) demostraron que los macrófagos de ratones lactantes infectados con HSV-2, liberan más virus que los de animales adultos, y lograron además, proteger a ratones lactantes de la infección por la transferencia de células del exudado peritoneal de animales adultos.

Otros modelos, en los cuales las células macrofágicas juegan un papel importante en la resistencia del huésped relacionada con la edad, son: la hepatitis causada en ratones por HSV-2 (110), la infección por citomegalovirus murinos (CMV) (111) y por virus de la fiebre amarilla (90).

c) Muchas especies animales son susceptibles a la infección con ciertos virus, mientras que otras son resistentes. Además, la variación en la resistencia de miembros de una misma especie, indican que ciertos factores genéticos juegan un papel trascendente.

En algunos modelos, se ha demostrado que los macrófagos expresan a nivel celular la resistencia genética observada "in vivo", por ejemplo, López y Dudas (112) intentaron correlacionar la multiplicación en macrófagos de HSV-1 en cepas resistentes y sensibles a la infección. Aunque los macrófagos de ratones C57 Bl/6, que resisten la acción viral, restringieron la replicación mejor que los de ratones Balb/c y A/S (moderadamente y muy susceptibles respectivamente), dicha capaci

dad no implicó resistencia genética, ya que los macrófagos de cepas resistentes (C57Bl/6 x A/J) y (C57Bl/6 x BALB/c)F₁ no pudieron restringir la replicación de HSV-1.

1.4. VÍAS DE ACCESO DE LOS VIRUS AL SNC

1.4.1. Vía neural

La diseminación viral al SNC a lo largo de los nervios periféricos fue la primera vía sugerida tanto por observaciones clínicas como por estudios experimentales. Así, la ruta neural actuaría como puerta de entrada al SNC del virus de la rabia y de HSV. Los primeros estudios con virus polio, sostenían también invasión del SNC a lo largo de las fibras nerviosas (113).

1.4.2. Vía olfatoria

Bajo condiciones experimentales algunos virus pueden invadir el SNC directamente desde la mucosa olfatoria. La inoculación intranasal o el uso de aerosoles con HSV, virus West Nile o virus de la rabia produjo una infección de las neuronas del bulbo olfatorio en ratones lactantes (114) (115) (116).

1.4.3. Vía hemática

Estudios experimentales y observaciones en el hombre han indicado que la mayoría de las infecciones virales del SNC son adquiridas a través de la sangre. El reconocimiento de la importancia de la viremia para que un virus logre alcanzar el cerebro, se demostró en chimpancés infectados oralmente con virus polio en los cuales la viremia precedió la invasión del

SNC (117).

Evidencias experimentales indican que la mayor parte de los virus multiplican en sitios extraneurales, establecen una viremia por uno o varios mecanismos y pasan de la sangre al cerebro o líquido cefalorraquídeo por distintas vías (113).

Aunque el virus liberado a la corriente sanguínea es eliminado normalmente por el sistema retículoendotelial, ésto puede ser impedido por varios mecanismos: a) replicación en el endotelio vascular o tejidos linfáticos, manteniéndose de esta forma en elevadas concentraciones en el plasma (118); b) asociación a células sanguíneas resultando así protegidos de la función de "limpieza" del sistema retículoendotelial (119), esta asociación protege también al virus de la neutralización por anticuerpos circulantes o de la inactivación por inhibidores no específicos del suero; c) por alteraciones en la eficiencia del sistema retículoendotelial.

Los virus pueden pasar de la sangre al cerebro o líquido cefalorraquídeo por varios sitios anatómicos y por diferentes mecanismos.

Los capilares cerebrales no presentan fenestraciones, tienen uniones herméticas y membranas densas y están densamente empacados contra los pies chupadores de los astrocitos. Esta configuración representa la barrera morfológica hematoencefálica. A pesar de ello, muchos virus logran atravesar esta ba-

rrera, infectando primero las células de los endotelios vasculares del SNC y luego la glía y neuronas adyacentes (118) (120) (121). Sin embargo, otros virus infectan directamente la glía que rodea a los pequeños vasos, sin que existan evidencias de infección de las células endoteliales (122) (123). En algunas infecciones, los virus podrían ser transportados por leucocitos infectados que franqueen las células endoteliales (124).

La estructura de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo es diferente, ya que los capilares presentan mayor permeabilidad debido a la fenestración de los endotelios vasculares del plexo coroideo. A pesar de ello, las partículas virales no tienen libre acceso al líquido cefalorraquídeo ya que tanto las células epiteliales del plexo coroideo como las células pioaracnoideas, están adheridas por fuertes uniones apicales, constituyendo así la barrera sobre la superficie cerebral. Los virus que pasan de la sangre al estroma del plexo coroideo pueden potencialmente infectar las células epiteliales y diseminar el virus directamente en el líquido cefalorraquídeo o bien ser transportados por pinocitosis a través de las células epiteliales.

Existen evidencias que demuestran que algunos virus infectan el plexo coroideo, luego las células ependimarias y finalmente las células del parénquima, sugiriendo la posi-

bilidad de invasión del líquido cefalorraquídeo vía plexo co
roideo (125) (126) (127).

Concluyendo, la invasión del SNC a partir de la sangre requiere una secuencia de eventos que involucran los tejidos extraneurales, sangre y membranas que separan la sangre del cerebro.

2. OBJETIVOS

La rata es un animal de laboratorio usado muy frecuentemente para estudios de infecciones virales debido a la gran susceptibilidad que presenta frente a un gran número de virus, así como la facilidad que brinda en cuanto a su reproducción y manejo.

La infección por vía ip con VJ en ratas de 2 días de edad provoca a la inversa de lo que sucede utilizando la vía ic, un 80% de mortalidad con signos neurológicos al emplear VXJ, mientras que con VXJCl3, ésta no supera un 20% (62).

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio detallado de la infección de la rata con VJ por vía ip, ya que resulta un modelo de gran interés por desarrollar una enfermedad neurológica luego de una infección extraneural.

La finalidad del presente estudio puede dividirse en varios aspectos:

1) Desde que la rata de 2 días de vida inoculada por vía ip se comporta de manera similar al cobayo en lo que se refiere a su mortalidad de acuerdo a la cepa de VJ empleada, se ha realizado un estudio exhaustivo para determinar si la vía extraneural puede permitir diferenciar cepas patógenas y atenuadas con la posibilidad de ser usada, al igual que el cobayo,

como un marcador de atenuación.

Para ello fueron determinados:

- a) La sensibilidad de la rata dependiente de la edad con distintas cepas y dosis de VJ.
 - b) La replicación viral en distintos órganos en animales infectados con ambas cepas virales por las técnicas de unidades formadoras de placas, co-cultivo e inmunofluorescencia.
 - c) La respuesta humoral específica valorando los anticuerpos neutralizantes, fijadores de complemento e inmunofluorescentes.
- 2) A fin de indagar los mecanismos patogénicos desencadenados por la infección viral se intentaron determinar:
- a) Las alteraciones anatomopatológicas en los principales órganos de los animales infectados.
 - b) La presencia de complejos inmunes.
 - c) El efecto de la transferencia de inmunosuero anti-virus.
- 3) En una infección experimental por vía ip, resulta de gran interés el estudio de la interacción macrófagos peritoneales-virus, para determinar la influencia de estas células en la sensibilidad o resistencia a la acción viral. Con dicha finalidad se estudiaron:
- a) La determinación de la capacidad macrofágica "in vitro" de elementos sanguíneos y células peritoneales de animales adultos y de 2 días de vida infectados con ambas cepas de VJ uti-

lizando Staphylococcus aureus.

- b) La replicación del virus en células peritoneales de ratas del grupo etario de 2 días y de animales adultos inoculados con VXJ y VXJCl3, utilizando la técnica de centros infecciosos e inmunofluorescencia.
 - c) La acción de la administración de sílica, la cual bloquea la capacidad fagocitaria de los macrófagos, en animales sensibles a la infección (ratas de 2 días de vida infectadas con VXJ) y resistentes a la misma, (ratas de 2 días de edad inoculadas con VXJCl3 y de 11 días de edad infectadas con VXJ).
 - d) La transferencia de macrófagos de animales adultos a lactantes, previo a la infección de estos últimos con VXJ.
 - e) El efecto de la transferencia de macrófagos de animales infectados, a ratas de 2 días receptoras.
- 4) Es conocido el hecho de que los virus pueden alcanzar el SNC por vía hemática. El modelo rata inoculado por vía ip permite evaluar, tanto la diseminación inicial a tejidos vasculares (hígado y bazo) como la subsiguiente multiplicación viral que conduciría eventualmente a una viremia de suficiente magnitud como para invadir el SNC. El curso de una infección viral luego de una inoculación periférica puede depender de la interacción inicial virus-macrófago.

Para estudiar las vías de acceso al SNC se han realizado

los ensayos de co-cultivo y de replicación viral en macrófagos descritos en los puntos 1b y 3b respectivamente.

5) Se determinó además, la existencia de protección cruzada, basándose este estudio en los resultados obtenidos previamente, o sea la susceptibilidad hacia las distintas cepas virales en relación con las edades, vías, dosis y respuesta a nivel de anticuerpos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. ANIMALES

3.1.1. Ratas

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de exocría y de la cepa endocriada Buffalo/Sim (Simonsen Lab. Inc.; Gilroy, USA), las cuales fueron reproducidas y criadas en el bioterio de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, UBA.

Los animales fueron alojados en jaulas en grupos de 10 como máximo, y las hembras preñadas en cajas individuales de acero inoxidable donde se mantuvieron hasta el destete de las crías.

Las hembras preñadas se observaron diariamente con el objeto de registrar el momento exacto de la parición.

Los animales fueron alimentados con Purina, alimento balanceado comercial, y agua "ad libitum".

3.1.2. Ratones

Se utilizaron ratones de la cepa Rockland de 48-72 hs de vida para obtención de las suspensiones de virus y para estudiar la presencia y cuantificación de virus en determinadas muestras.

3.1.3. Carnero

Se usó para la obtención de glóbulos rojos. Fue donado por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) (Raza criolla, de 12 a 18 meses de edad).

3.2. VIRUS JUNIN (VJ)

3.2.1. Cepa prototipo XJ (VXJ)

Fue aislada a partir de sangre de un enfermo de Fiebre Hemorrágica Argentina procedente de la ciudad de Junín por Parodi y col. en 1958 (1) y mantenida en cerebro de ratón lactante.

El título de la suspensión en cerebro de ratón lactante calculando según el método de Reed y Muench (128) fue de $10^{7,7}$ DL₅₀/ml (dosis letal 50).

3.2.2. Cepa XJC13 (VXJC13)

Deriva originariamente de VXJ en el pasaje C2R11. Fue clonada en células MA111 (línea heteroploide de riñón de conejo) en el Laboratory of Tropical Virology, USA.

El título de la suspensión en cerebro de ratón lactante calculado por el método de Reed y Muench fue de $10^{8,4}$ DL₅₀/ml.

3.3. PREPARACION DE LAS SUSPENSIONES DE VIRUS

Las suspensiones de virus se prepararon a partir de cere

bro de ratones de 48-72 hs de vida, los cuales fueron inoculados con 10^3 DL₅₀ de cada una de las cepas por vía ic contenidas en 0,02 ml. Los animales se sacrificaron al séptimo día pi, preparando con los cerebros un homogeneizado al 10% en medio de Hanks con 10% de suero de ternera inactivado. Luego de centrifugados a 10.000 rpm durante 60 minutos, los sobrenadantes fueron envasados en alícuotas de 0,5 ml y congelados a -70°C. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

3.4. CULTIVO DE TEJIDOS

Fue empleada la línea continua de riñón de mono verde africano Cercopithecus aethiops, denominada Vero. El virus replica en estas células, dando lugar a una acción citopatógena característica (129). La línea se mantuvo mediante dos repiques semanales.

3.4.1. Medios de cultivo y soluciones

- Medio de crecimiento: Para la preparación de 100 ml se mezclaron 10 ml de minimal essential medium (MEM) 10 X con 10 ml de aminoácidos no esenciales, 2,8 ml de bicarbonato al 5% en agua bidestilada, 1 ml de antibiótico (Penicilina 100 U/ml y Estreptomina 100 mg/ml) y se llevaron a 100 ml con agua bidestilada. Se agregó luego 5% de suero de ternera inactivado.

- Medio de mantenimiento: Fue preparado de igual manera que el medio de crecimiento, pero se adicionó 2% de suero de ternera inactivado.
- Solución de Hanks: Fue utilizada como diluyente y para el lavado de los órganos empleados.
- Metil celulosa (MC, Methocel 1500 cP, Fluka): Se preparó una suspensión al 1,6% en agua bidestilada y luego de agitarla durante toda la noche a 4°C, fue fraccionada y esterilizada en autoclave.
- Solución de tinción de placas: Se preparó momentos antes de su uso utilizando una parte de cristal violeta al 0,02%, una de formol y ocho de agua corriente.

3.5. PROCESAMIENTO DE LOS ORGANOS PARA AISLAMIENTO VIRAL

Los órganos extraídos fueron homogeneizados al 10% en medio de Hanks con 10% de suero de ternera inactivado. Luego de una centrifugación a 4°C durante una hora a 10.000 rpm, se cosechó el sobrenadante, fraccionándolo y congelándolo a -70°C hasta su uso.

3.6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO

Se obtuvo a partir de sangre, manteniéndola a 4°C durante 24 hs. Luego de centrifugación por 10 minutos a 1.500 rpm,

el suero fue separado, fraccionado y conservado a -70°C (para aislamiento viral) o a -20°C (para titulación de anticuerpos).

3.7. DETECCION DE VIRUS EN ORGANOS

3.7.1. Unidades formadoras de placas (UFP)

Se utilizó la técnica descrita por Giovanniello y col. (130).

Las células fueron dispersadas con tripsina al 0,25% y llevadas a una concentración de $2,8-3,1 \times 10^5$ células/ml en medio de crecimiento. Dos mililitros de la suspensión fueron sembrados en policubetas de poliestireno con 6 orificios de 35 mm de diámetro y fondo plano (Linbro Tissue Culture Plate). Se deshechó el medio 18 hs más tarde, cuando la monocapa aún no estaba formada, y se infectaron los cultivos con 0,1 ml de las diluciones al décimo de los materiales. Las placas fueron agitadas e incubadas 1 hora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 96% de humedad para lograr la adsorción del inóculo. Luego se adicionó a cada cavidad 2 ml de medio de crecimiento 2 X y Metil Celulosa al 1,6% previamente calentada a 37°C , en proporción 1:1 e incubadas nuevamente en las condiciones ya explicadas.

Al 5° día pi se agregó 1,5 ml de medio de mantenimiento

a cada cubeta y dos días más tarde fueron reveladas con 2 ml de cristal violeta, luego de eliminar el medio semisólido. Una hora más tarde se lavó con agua corriente y las UFP fueron contadas, calculando los títulos con la siguiente fórmula:

$$\text{Título UFP/ml: } \frac{N \cdot D}{V}$$

N: número de placas

V: volumen del inóculo

D: dilución inoculada

3.7.2. Técnica de Co-cultivo:

La técnica de Co-cultivo es de gran sensibilidad y permite la detección de virus aún cuando esto no pueda lograrse por los métodos convencionales (131).

Las células Vero fueron tripsinadas, centrifugadas y llevadas a una suspensión de 1×10^5 células/ml en medio de crecimiento. Se utilizaron botellitas de caras planas sembrando 2 ml de la suspensión celular, para el aislamiento de virus en órganos y 4 ml en el caso de aislamiento a partir de sangre.

La extracción de sangre se realizó por decapitación o punción cardíaca (según la edad de los animales), y fue recogida en un tubo con 0,2 ml de heparina diluída 1:10 en solu-

ción fisiológica (SF). Se le agregó una cantidad igual a la obtenida de antibiótico, incubándola luego 1 hora a temperatura ambiente.

Los órganos fueron extraídos estérilmente y colocados en cajas de Petri con antibiótico; se lavaron 3 veces con solución de Hanks y por último se les agregó medio de crecimiento. Luego de disociar los tejidos, se sembraron 2 ml conteniendo algunos trozos en las botellas ya preparadas.

Para realizar el aislamiento a partir de sangre, se utilizó 0,1 ml de la misma.

Los co-cultivos de los tejidos disociados y las células fueron controlados durante una semana, cambiando el medio en caso de ser necesario. En los realizados con sangre, fue imprescindible el lavado y agregado de medio a las 24 hs pi, para eliminar los glóbulos rojos en exceso que resultan tóxicos para las células.

Al 7° día pi se recogieron los sobrenadantes, fraccionándolos y conservándolos a -70°C hasta su utilización, y los co-cultivos fueron sometidos a 5 repiques sucesivos para aumentar la posibilidad de replicación viral.

Los materiales obtenidos se sembraron en cultivos celulares para la detección de UFP como se describió en 3.7.1. e inoculados a ratones lactantes por vía ic en un volumen de 0,02 ml con el objeto de aislamiento viral. Estos fueron con

siderados positivos, cuando los ratones presentaron los signos neurológicos característicos de la encefalitis producida por el VJ y su posterior muerte (41).

En los casos en los que el aislamiento no fue posible, se utilizaron los sobrenadantes del 5° subcultivo para confirmar dicha negatividad.

3.7.3. Inmunofluorescencia

Muestras de cerebro y bazo fueron congeladas en acetona-hielo seco y conservadas a -70°C hasta el momento de su procesamiento. Se efectuaron cortes de $4\ \mu$ con micrótomo de congelación. La tinción se realizó con inmunosuero de rata anti-VJ diluído 1:10 (obtenido según se describe en 3.12.) incubándose 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS durante 10 minutos, sometiendo luego los cortes a tratamiento por 30 minutos con antigamaglobulina de rata obtenida en cabra, marcada con isotiocianato de fluoresceína diluída 1:32 (Dako, Denmark). Como control se utilizó suero normal de rata. Luego de lavados, los preparados fueron observados con microscopio Carl Zeiss con epi-iluminación.

3.8. DETECCION DE INMUNOCOMPLEJOS

Los órganos fueron tratados según se describe en 3.7.3. y los cortes se incubaron durante 30 minutos a temperatura

ambiente con antigamaglobulina de rata marcada con fluoresceína (Dako, Denmark) por 30 minutos y luego de ser lavados fueron observados con microscopio de fluorescencia.

3.9. VALORACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS

3.9.1. Titulación de anticuerpos neutralizantes (Ac Nt)

Se empleó la técnica de suero variable - virus constante.

Los sueros fueron diluidos al décimo en medio de Hanks y se inactivaron a 56°C durante 30 minutos. Luego de realizar diluciones al medio, se mezclaron con 400 DICT50 (dosis infectante de cultivo de tejidos) de VXJCl3. Tras una hora de incubación a 37°C se realizó la prueba de UFP como se describió en 3.7.1.

El título de los sueros fue expresado como la inversa de la dilución que inhibe la formación del 50% de las UFP presentes en el control virus.

3.9.2. Titulación de anticuerpos fijadores de complemento (Ac Fc)

3.9.2.1. Obtención del antígeno

Se utilizó el antígeno preparado según la técnica de Casals (132). Para ello, un macerado de cerebro de ratones infectados a los 2 días de edad con 10^3 DL₅₀ de VXJCl3 por vía ic y sacrificados 7 días más tarde fue deshidratado 3 veces

con acetona y rehidratado con SF, durante 12 hs aproximadamente. Al cabo de una hora de centrifugación a 10.000 rpm se fraccionó el sobrenadante y conservó a -70°C. Todo el proceso se realizó a 4°C.

3.9.2.2. Técnica de fijación de complemento

Para titular los Ac Fc se utilizó la técnica de microplacas, realizando diluciones al medio de los sueros (previamente inactivados 30 minutos a 56°C) con 25 µl de buffer Veronal por medio de microdiluidores calibrados para dicho volumen (Microtiter, Cooke, Engineering CO). A cada cavidad se adicionó 25 µl de antígeno diluído 1:20 con una pipeta gotero (Microtiter, Cooke, Engineering CO). Luego de una incubación de 15 minutos a 37°C se agregaron 25 µl de complemento de cobayo (5 dosis mínimas hemolíticas 50%), manteniéndola una noche a 4°C. Para completar la reacción fue adicionado 50 µl de mezcla hemolítica compuesta por partes iguales de glóbulos rojos de carnero al 2% y hemolisina diluída al medio (Sudiar, título=1:3200), incubando a 30 minutos a 37°C y centrifugando 5 minutos a 1000 rpm. El título se expresó como la inversa de la dilución que presentó un 50% de hemólisis.

3.9.3. Titulación de anticuerpos inmunofluorescentes (Ac IF)

3.9.3.1. Monocapas de células infectadas

Células BHK persistentemente infectadas (133) cultivadas en tubos de Leighton en una monocapa confluyente, fueron lavadas con PBS, fijadas con acetona fría a 4°C durante 10 minutos y conservadas a -20°C.

3.9.3.2. Determinación del título de Ac IF

Las células fijadas según 3.9.3.1. fueron cubiertas por 30 minutos a temperatura ambiente con diluciones de los sueros a testear. Se lavó durante 10 minutos con PBS, adicionando luego el conjugado fluorescente (gamaglobulina de cabra-anti gamaglobulina de rata), incubando nuevamente 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, los preparados fueron leídos inmediatamente en microscopio de fluorescencia.

El título de Ac IF se expresó como la inversa de la máxima dilución que permitió observar fluorescencia.

3.10. ESTUDIOS DE ANATOMIA PATOLOGICA

Los estudios anatomopatológicos fueron realizados por la Dra. Victoria Muñoz Saavedra. Para la observación con microscopía de luz, los órganos fueron fijados en solución de Bouin, incluidos en parafina y los cortes de 4 μ fueron coloreados

con Hematoxilina Eosina según los procedimientos habituales.

3.11. ESTUDIOS REALIZADOS CON CELULAS PERITONEALES Y MACROFAGICAS

3.11.1. Obtención de células peritoneales

Las células fueron obtenidas por lavado de la cavidad peritoneal. Para ello fue inyectado medio de Hanks adicionado de antibióticos, 10% de suero fetal bovino y heparina (5 unidades/ml) en la cavidad peritoneal con una jeringa de plástico descartable. Después de suaves masajes sobre la piel del abdomen se practicó en la misma un pequeño orificio por el que se extrajo el líquido inoculado por aspiración centrifugándolo a 1000 rpm en tubos de plástico. Una vez lavado el sedimento las células fueron contadas y diluidas a concentraciones adecuadas.

3.11.2. Purificación de macrófagos a partir de células de exudado peritoneal

Se utilizaron placas de Petri descartables de 100 mm (Bristerilpla-K, Britania), las cuales fueron incubadas 24 hs a 4°C con gelatina al 0,01% en agua bidestilada. Las células fueron obtenidas según se describió en 3.11.1. Se centrifugaron y resuspendieron en MEM con 10% de suero fetal bovino inactivado y heparina.

Fueron sembrados 10 ml conteniendo $1,5 \times 10^7$ células en las placas de Petri, luego de descartar la gelatina. Tras una incubación de una hora a 37°C en una atmósfera de 8% de CO_2 y 96% de humedad, el sobrenadante fue aspirado, para obtención de las células no adherentes y la monocapa fue lavada 3 veces en medio de Hanks.

Las células adherentes fueron removidas con tripsina y 0,04% de EDTA y luego de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se resuspendieron y se lavaron por centrifugación. La viabilidad se midió por exclusión con Azul Tripan.

Las poblaciones celulares presentes en cada fracción se determinaron por tinción con Naranja de Acridina, según la técnica descrita por Golstein y Blomgren (134). Para ello se centrifugaron suspensiones conteniendo $2,5 \times 10^6$ células, descartando el sobrenadante y resuspendiendo en 2 ml de Naranja de Acridina 1:100 en SF. Luego de una incubación en oscuridad a 37°C durante 30 minutos se observó en microscopio de fluorescencia.

Los linfocitos se presentan como células de tamaño medio, con núcleos verdes y citoplasma ausente o presente como un anillo o en un polo. Los macrófagos se observan como células de tamaño grande; el núcleo es verde y en el citoplasma, de color verde claro, posee numerosas granulaciones de color rojo

brillante (lisosomas). Los polimorfonucleares poseen un núcleo verde amarillento con su forma característica y el citoplasma es verde con granulaciones escasas y rojizas. Los mastocitos se ven como mórulas de color rojo.

3.11.3. Determinación de la capacidad macrofágica "in vitro"

La capacidad macrofágica de células de sangre y de exudado peritoneal se valoró utilizando una cepa de Staphylococcus aureus fagotipo 80/81 empleando el método descrito por Nejamkis y col. (135).

Los estafilococos fueron conservados en medio sólido (tripticase soja-agar) cubierto con baselina líquida estéril y se repicaron cada 4 meses. 24 hs antes de su utilización fueron repicados en el mismo medio controlando su pureza por el método de Gram.

Las bacterias fueron resuspendidas en SF y ajustadas a una concentración de 1×10^8 gérmenes/ml según el método nefelométrico de McFarland (136). Luego se inactivaron durante 30 minutos a 56°C.

3.11.3.1. Medida de la capacidad fagocitaria de los elementos sanguíneos

A 0,8 ml de sangre le fueron adicionados 0,15 ml de citrato trisódico al 4%.

Alícuotas de muestras de sangre y suspensión de estafilo-

cocos fueron mezcladas e incubadas a 37°C durante 30 minutos, tras lo cual se realizaron 3 extendidos por muestra los que fueron coloreados con la técnica de Leishman.

La medida de captación fagocitaria fue determinada sobre 100 leucocitos polimorfonucleares, obteniendo el porcentaje de los elementos sanguíneos que presentaron fagocitosis.

3.11.3.2. Medida de la capacidad fagocitaria de las células de exudado peritoneal

Las células se obtuvieron según lo descrito en 3.11.1.

Luego de centrifugadas se resuspendieron en Hanks conteniendo 30% de suero de rata normal inactivado y se las llevó a una concentración de 2×10^7 células/ml. De esta suspensión celular se colocaron 0,05 ml en portaobjetos, incubándolos en cámara húmeda a 37°C durante 15 minutos para obtener la fijación de los macrófagos al vidrio.

Manteniendo los portaobjetos en la cámara húmeda se agregaron 0,05 ml de una suspensión de 1×10^8 gérmenes/ml y se continuó la incubación durante 45 minutos más. Al cabo de este tiempo se sumergieron los portaobjetos (para lavar las células no adheridas) por 30 segundos en SF y luego de secados se tiñeron primero con coloración de Gram y a continuación con May-Grunwald Giensa.

La capacidad fagocitaria fue determinada sobre 100 células,

obteniendo el porcentaje de los macrófagos peritoneales que presentaron fagocitosis.

3.11.4. Replicación del virus en los macrófagos

3.11.4.1. Determinación de centros infecciosos

La técnica para valoración de centros infecciosos (137) (111) se realizó en las mismas condiciones descritas para la obtención de UFP (3.7.1.). Los macrófagos peritoneales fueron incubados una hora a 37°C con inmunosuero anti VJ (obtenido según se describió en 3.12.) y sembrados en una concentración de 10^5 ; 10^4 y 10^3 células contenidas en 0,1 ml.

La cantidad de células en las cuales había replicación viral fueron calculadas como el número de placas/ 10^4 células sembradas.

3.11.4.2. Inmunofluorescencia

Las células se obtuvieron según descrito en 3.11.1.. Luego de ser lavadas, se sembraron 100 μ l en portaobjetos, e incubaron durante una hora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 96% de humedad.

Las células fueron fijadas con acetona a 4°C durante 10 minutos y luego teñidas de acuerdo a lo detallado en 3.7.3.

3.11.5. Tratamiento con Sílica (Si)

La Si (Silicon Dioxide; SiO₂, Sigma) fue resuspendida en SF en una concentración de 100 mg/ml, esterilizada con vapor fluyente, y previamente a su uso tratada con ultrasonificación para disgregarla.

3.12. OBTENCION DE INMUNOSUERO (IS) ANTI-VIRUS JUNIN

Ratas adultas fueron inoculadas por vía ip con 10⁵ DL₅₀ de VXJCl3 en tres dosis con 15 días de intervalo. Los animales se sangraron 2 semanas después de la última dosis. El título de Ac Nt fue de 320.

3.13. ESQUEMAS EXPERIMENTALES

Se detallan en resultados.

3.14. ESTUDIOS ESTADISTICOS

Se realizaron utilizando el test t de Student y la prueba de χ^2 . Se tomaron como significativos los valores de $p < 0,05$.

3.15. GRADOS CLINICOS DE ENFERMEDAD

Los grados clínicos se establecieron con el siguiente criterio:

Grado 0: animales no enfermos.

Grado 1: animales que presentaban temblores y/o excitación.

- Grado 2: animales que presentaban lateralización de la marcha.
Grado 3: animales que presentaban parálisis del tren posterior.
Grado 4: animales que presentaban todos los signos.

Los datos fueron calculados según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice del grado clínico: } \frac{\sum n \cdot g}{N}$$

n: número de animales con determinado grado de enfermedad.

g: grado de enfermedad.

N: número total de sobrevivientes.

4. RESULTADOS

4.1. VARIACION DE LA SENSIBILIDAD CON LA EDAD DE RATAS IN- FECTADAS CON VJ

Se utilizaron ratas Wistar de 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 10; 16 y 26 días de vida, las cuales fueron inoculadas por vía ip con 10^3 DL₅₀ (contenidas en 0,02 ml) de cada una de las cepas virales. Los animales infectados se observaron diariamente durante 35 días pi para controlar los signos clínicos de enfermedad y la mortalidad.

Los datos se expresan como promedio de grados clínicos obtenidos en los distintos días pi, según lo indicado en Materiales y Métodos (3.15.), así como el porcentaje acumulativo de mortalidad.

4.1.1. Sensibilidad de ratas infectadas con VXJ

- Animales de 1 día de vida: Fueron inoculadas 39 ratas. Como puede observarse en la Figura 1, la mortalidad registrada fue del 69,23%. Los animales comenzaron a manifestar signos clínicos de enfermedad a los 11 días pi, llegando a un máximo de 1,33 en el día 18 pi, desapareciendo a los 27 días pi. El día promedio de muerte fue 19,9.
- Animales de 2 días de vida: Se infectaron 63 ratas, en las que se observó el 84,13% de mortalidad (Figura 2). Los signos

Figura 1: Morbi-mortalidad de ratas de 1 día de edad infectadas con VXJ^a.

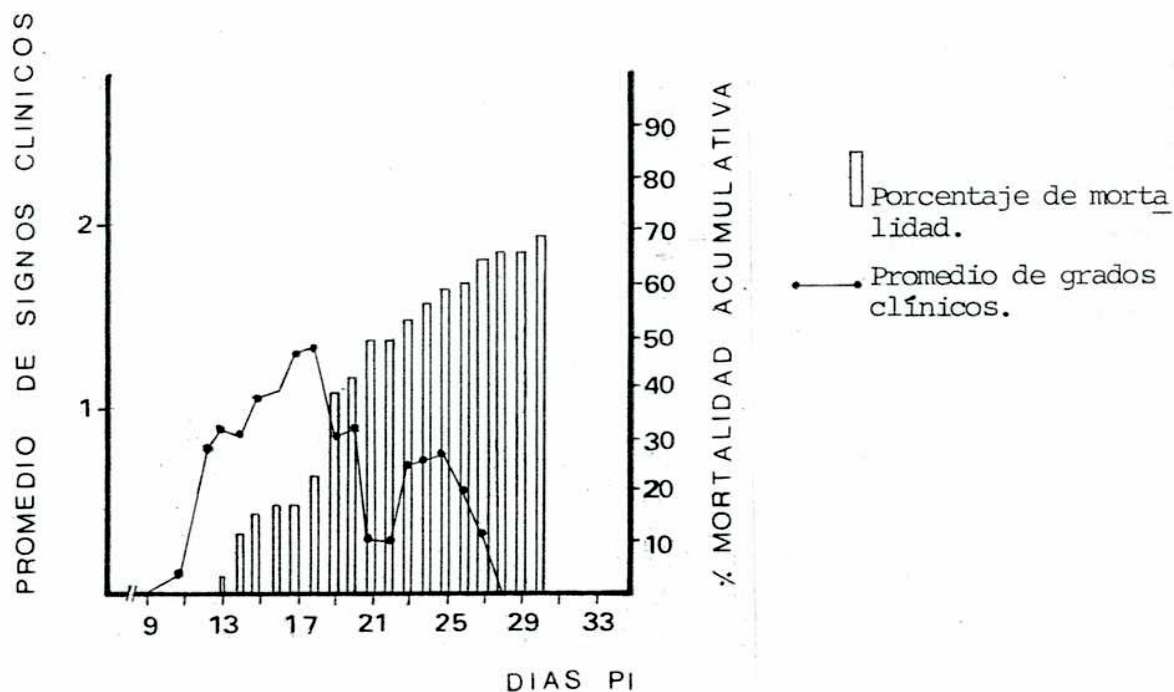
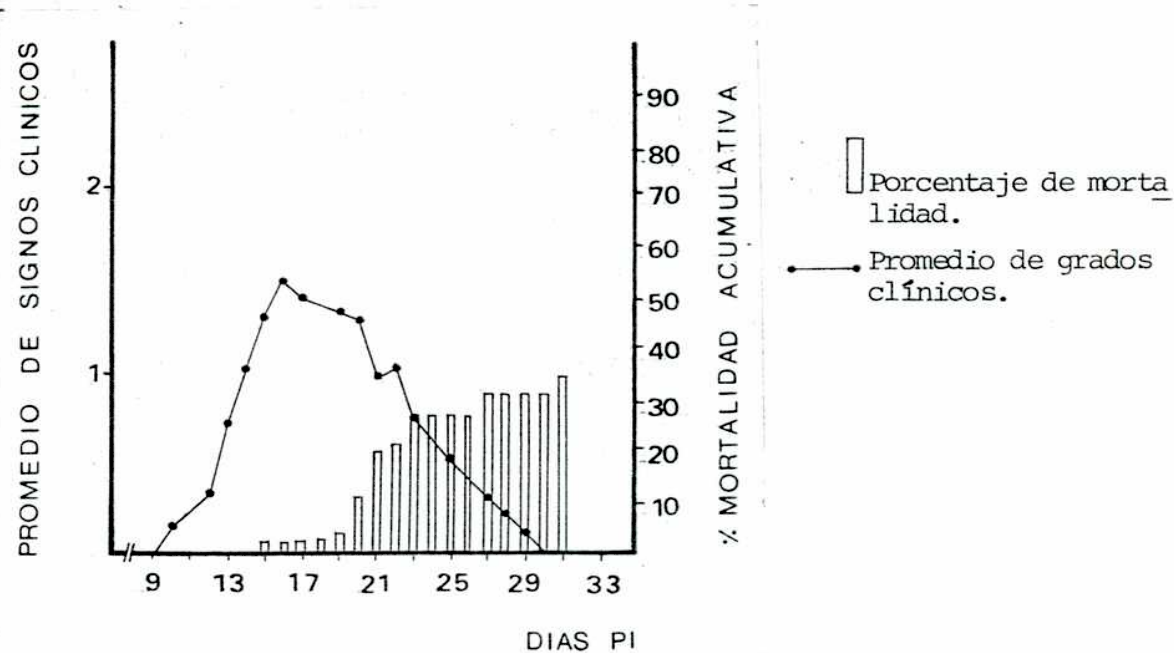
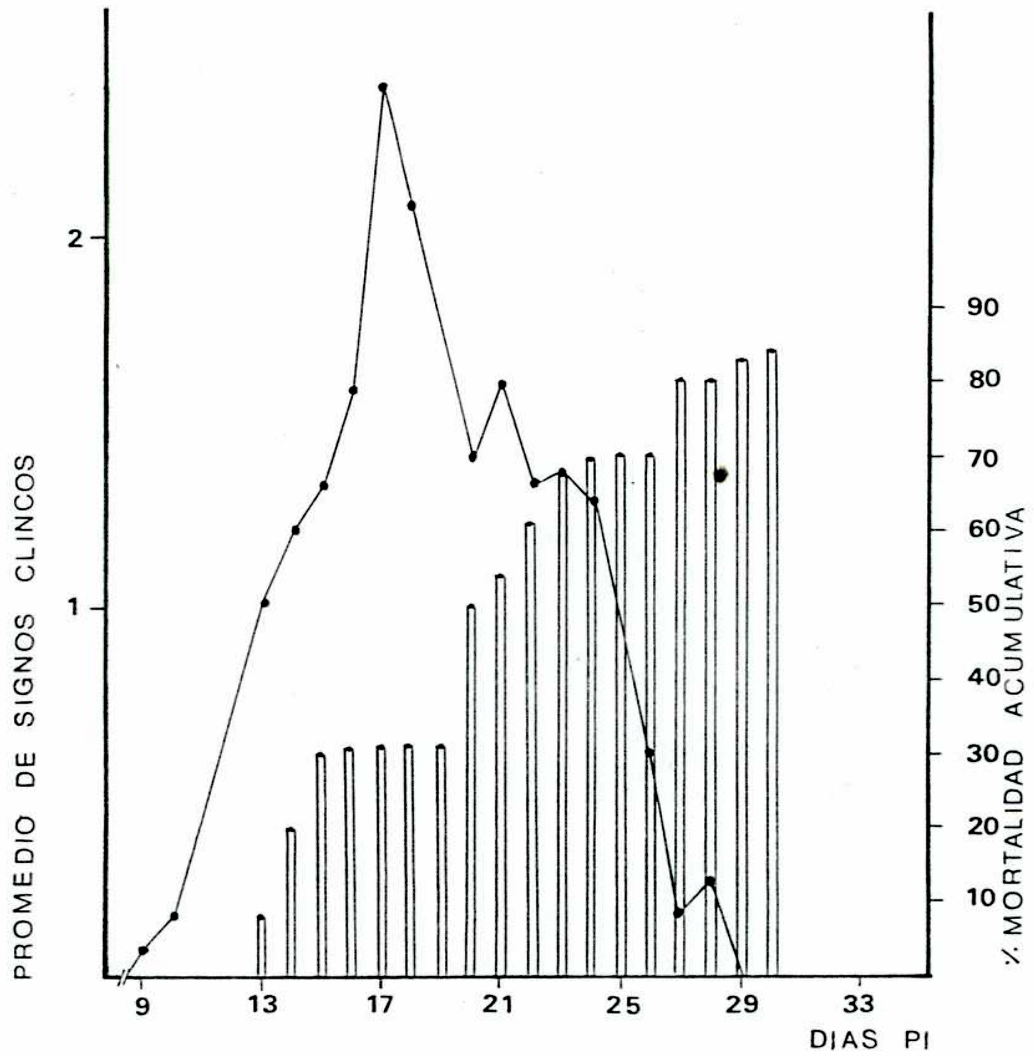


Figura 3: Morbi-mortalidad de ratas de 3 días de edad infectadas con VXJ^a.



a: Los animales fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml.

Figura 2: Morbi-mortalidad de ratas de 2 días de edad infectadas con VXJ^a.



□ Porcentaje de mortalidad acumulativa
● Promedio de grados clínicos de enfermedad

a: Los animales fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml.

clínicos de enfermedad comenzaron a aparecer alrededor del día 13 pi, alcanzando el promedio de grados de enfermedad un pico de 2,41 a los 17 días pi con un día promedio de muerte de 19,49. Los animales sobrevivientes se recuperaron paulatinamente desapareciendo la morbilidad después de los 29 días pi.

- Animales de 3 días de vida: Fueron utilizadas 26 ratas, las cuales presentaron una mortalidad del 34,62% (Figura 3). El día promedio de muerte fue 22,22. Los primeros signos clínicos comenzaron a aparecer a los 10 días pi, llegando a un máximo de 1,48 al día 16 pi.

- Animales de 4 días de vida: Se emplearon 36 ratas. Como se observa en la Figura 4, la mortalidad fue sólo del 13,88%, siendo el día promedio de muerte 18,6. El grado de enfermedad resultó mucho menor que el observado para las otras edades estudiadas con un máximo de 0,53 en el día 18 pi.

- Animales de 5 días de vida: Fueron inoculadas 31 ratas. La mortalidad registrada fue del 12,9% y en este caso también los signos de enfermedad fueron menores con una media de grados clínicos de 0,61 en el día 23 (Figura 5).

Con respecto a los grupos etarios restantes, fueron inoculados 31 animales de 6; 23 de 7; 40 de 10; 21 de 16 y 15

Figura 4: Morbi-mortalidad de ratas de 4 días de edad infectadas con VXJ^a.

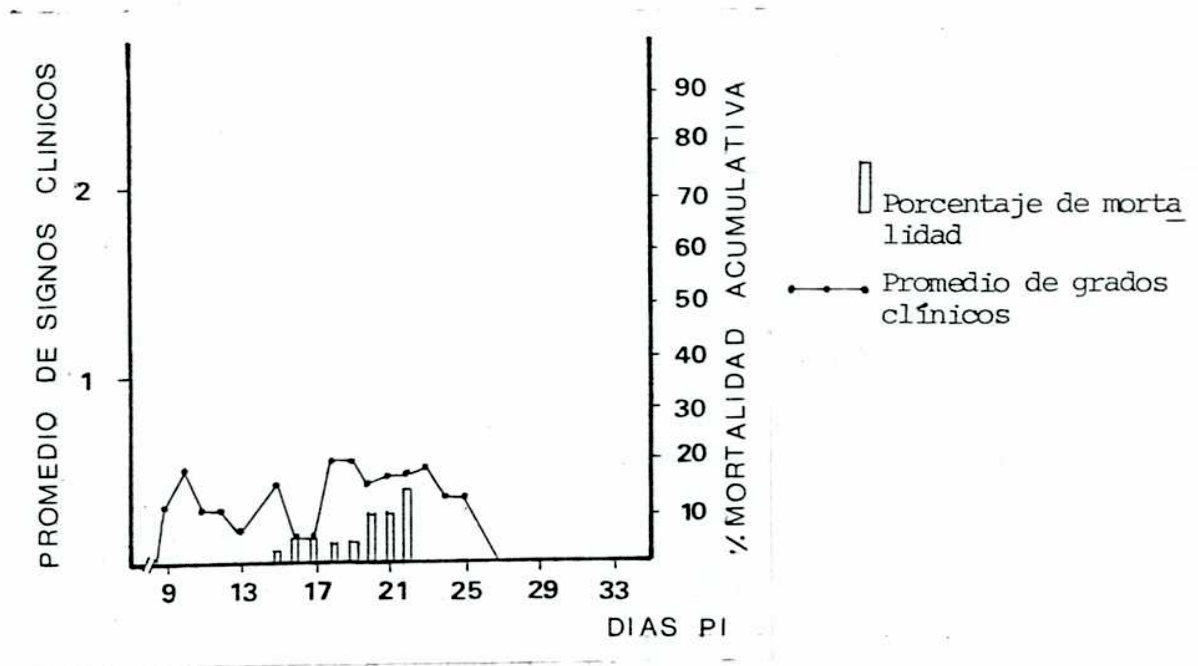
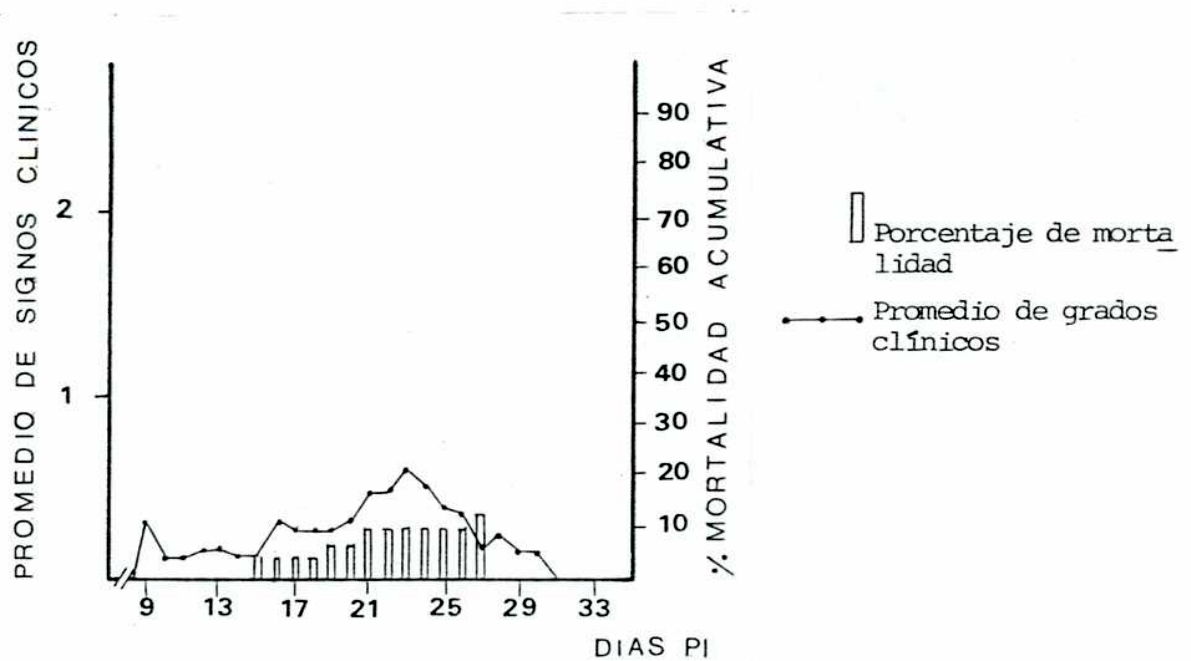


Figura 5: Morbi-mortalidad de ratas de 5 días de edad infectadas con VXJ^a.



a: Los animales fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml.

de 26 días de vida y en ningún caso se observó morbi-mortalidad.

Con las experiencias mencionadas se demostró que las ratas de 2 días de edad son las más sensibles a la acción de VXJ presentando los máximos grados de morbi-mortalidad.

4.1.2. Sensibilidad de ratas infectadas con VXJCl3

- Animales de 1 día de vida: Fueron infectadas 25 ratas. Como se observa en la Figura 6, el máximo grado de enfermedad (1,05) ocurrió entre los días 22 y 24 pi, alcanzando la mortalidad el 16% con un día promedio de muerte de 23,5.

- Animales de 2 días de vida: Se inocularon 34 ratas. La Figura 7 presenta los resultados obtenidos. Los signos de enfermedad fueron menores registrándose un pequeño pico de 0,6 a los 22 días pi, con una mortalidad del 17,65% y el día promedio de muerte fue 20,33.

- Animales de 3 días de vida: Se emplearon 28 ratas, las cuales presentaron una mortalidad del 14,28% (Figura 8), siendo el día promedio de muerte 24 y poco importantes los grados clínicos.

Con respecto al resto de las edades, fueron inoculados 40 animales de 5; 36 de 7; 24 de 10; 22 de 16 y 30 de 26 días de vida, y en ninguna de dichas edades se observó morbi-mortalidad.

Figura 6: Morbi-mortalidad de ratas de 1 día de edad infectadas con VXJCl3^a.

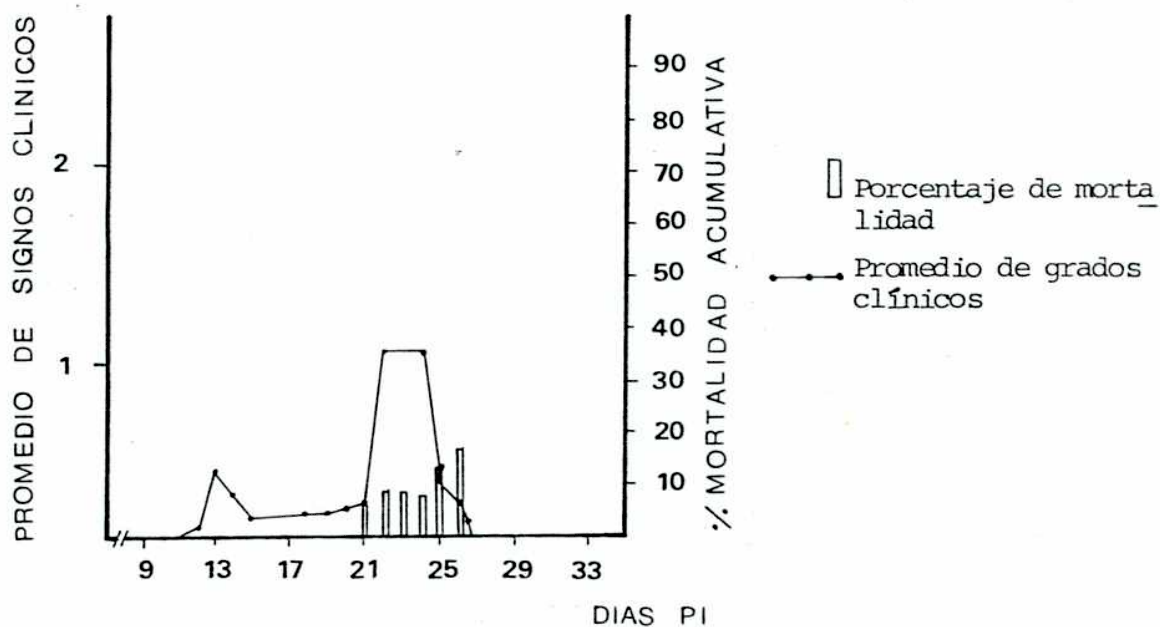
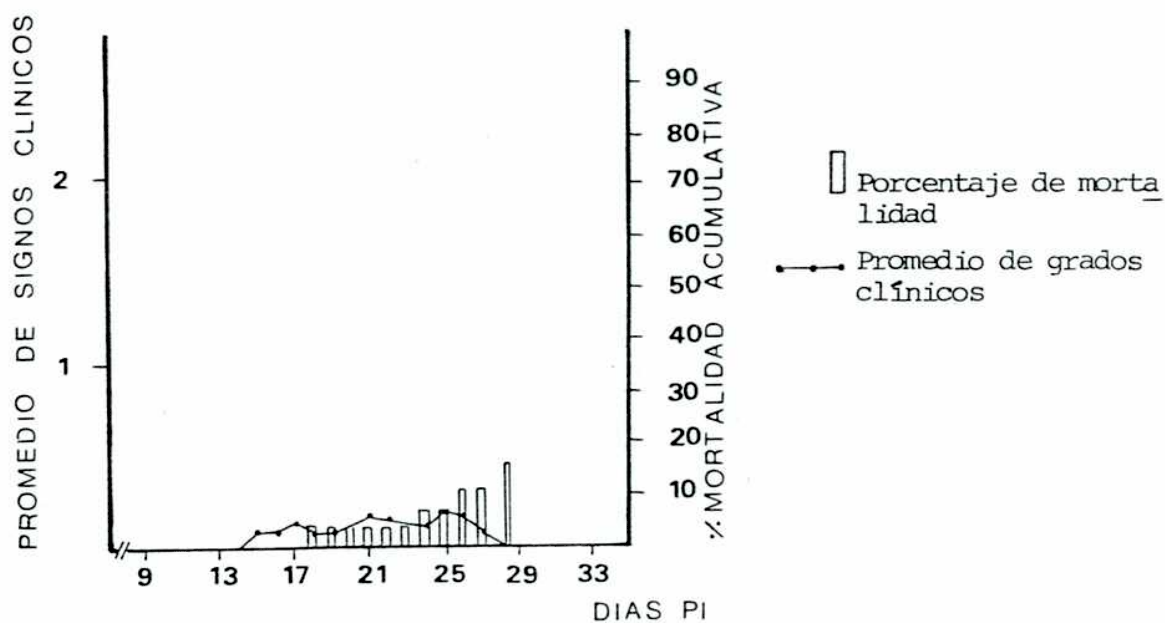
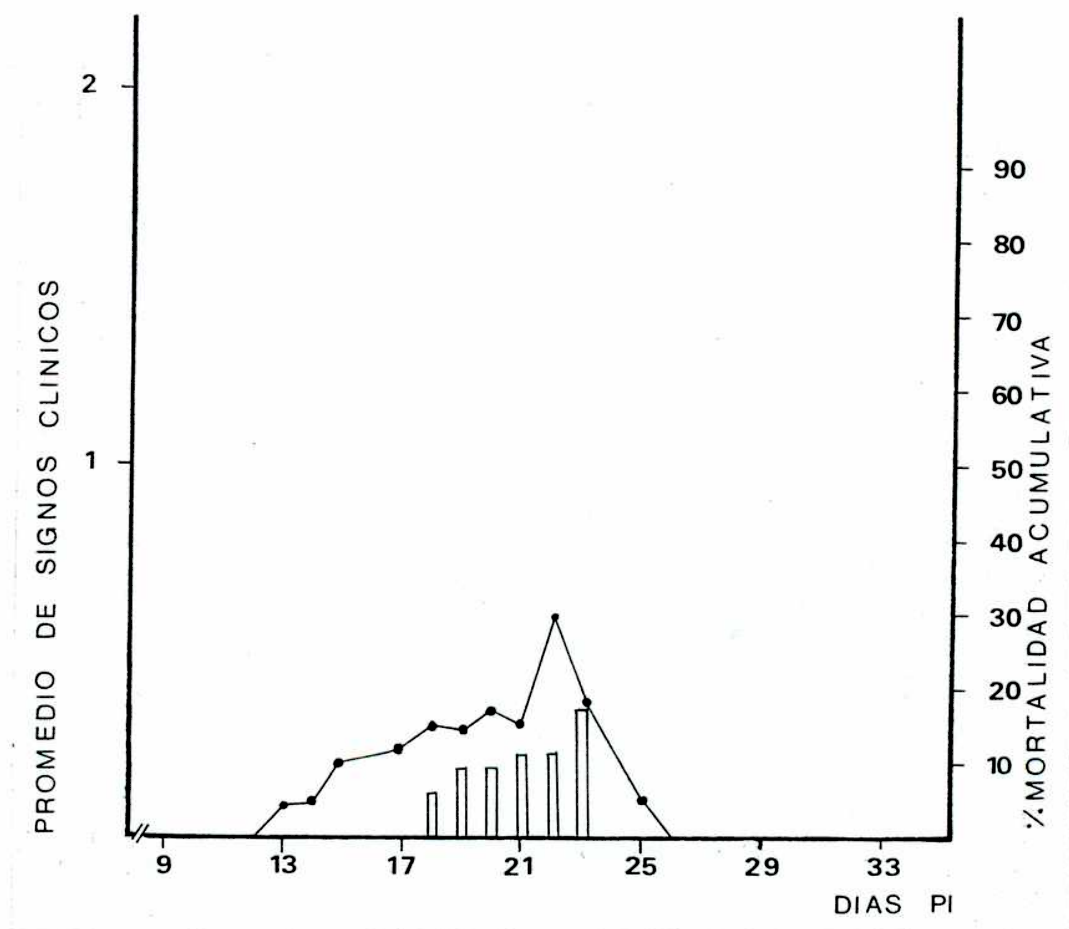


Figura 8: Morbi-mortalidad de ratas de 3 días de edad infectadas con VXJCl3^a.



a: Los animales fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml.

Figura 7: Morbi-mortalidad de ratas de 2 días de edad infectadas con VXJCl3^a.



□ Porcentaje de mortalidad acumulativa
● Promedio de grados clínicos de enfermedad

a: Los animales fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml.

Resumiendo, en los animales de 1; 2 y 3 días infectados con esta cepa, se produjo un reducido grado de morbi-mortalidad que no difiere en cada uno de estos grupos etarios.

La Figura 9 presenta en forma comparativa el porcentaje de mortalidad de ratas de diferentes edades infectadas con 10^3 DL₅₀ de ambas cepas de VJ por vía ip.

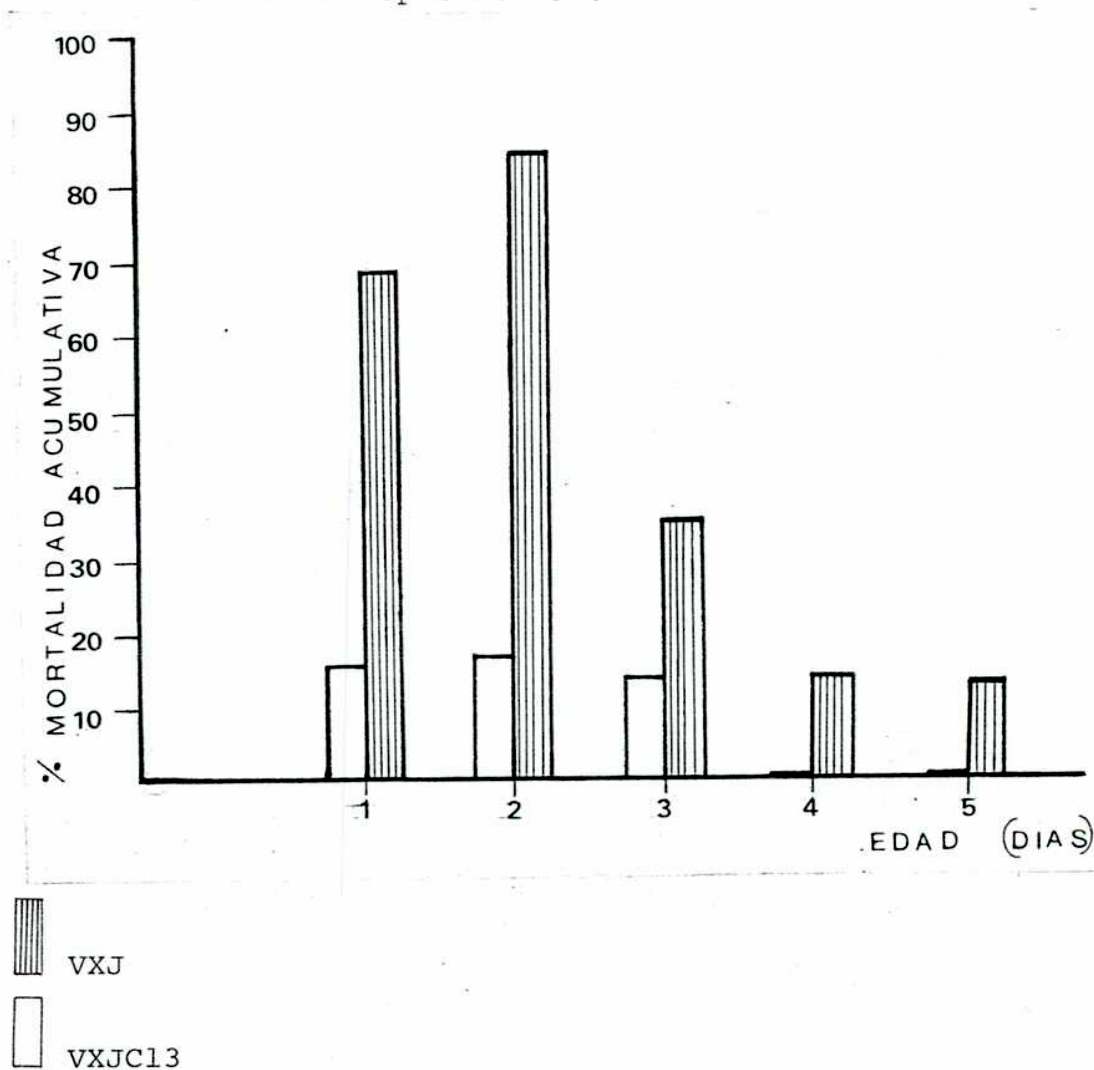
De acuerdo a los resultados obtenidos, se utilizaron para los restantes estudios, animales de 2 días de edad, por ser los que presentaron mayor diferencia en cuanto a la susceptibilidad hacia ambas cepas de VJ.

4.2. DESCRIPCION DE LOS SIGNOS CLINICOS OBSERVADOS EN RATAS DE 2 DIAS INFECTADAS CON AMBAS CEPAS DE VJ

La mayoría de las ratas infectadas con VXJ desarrollaron una severa encefalitis. Los primeros signos consistieron en temblores y/o excitación y aparecieron alrededor de los 13 días pi. Progresivamente, los animales presentaron lateralización de la marcha, la cual fue seguida, en algunos casos, por una parálisis flácida del tren posterior, aunque no todas las ratas mostraron este último signo en forma regular.

Se observó que los animales en los cuales la fase de excitación aparecía en forma tardía, eran los que solían recuperarse.

Figura 9: Mortalidad de ratas de diferentes edades infectadas con ambas cepas de VJ^a.



a: Los animales fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml.

En la Foto 1a se observa un animal enfermo a los 21 días pi, comparado a una rata normal (Foto 1b) de la misma edad.

En las ratas infectadas con VXJCl3 que presentaron mortalidad, los signos clínicos fueron similares.

4.3. VARIACION DE LA SENSIBILIDAD DE RATAS DE 2 DIAS INFECTADAS CON DIFERENTES DOSIS DE VJ

A fin de determinar cuál era la dosis óptima a utilizar en futuras experiencias, fueron inoculadas ratas de 2 días de vida con 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 DL₅₀ de ambas cepas virales por vía ip. La morbi-mortalidad se controló durante 35 días pi.

4.3.1. Sensibilidad de ratas infectadas con VXJ

Los animales infectados con 10^2 DL₅₀ presentaron sólo un 50% de mortalidad, siendo el día promedio de muerte 24,11. La mortalidad provocada por 10^3 , 10^4 y 10^5 DL₅₀ fue del 93,75; 70 y 63,15% respectivamente con un día promedio de muerte de 21,6; 18,7 y 19,25 para cada una de las dosis mencionadas.

El porcentaje acumulativo de mortalidad, el día promedio de muerte, así como la cantidad de animales utilizados para cada dosis se detallan en la Tabla 1.

4.3.2. Sensibilidad de ratas infectadas con VXJCl3

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 2 en la

Foto 1a: Rata de 2 días de edad infectada con 10^3 DL₅₀ de VXJ por vía ip, a los 21 días pi. Se observa parálisis del tren posterior.

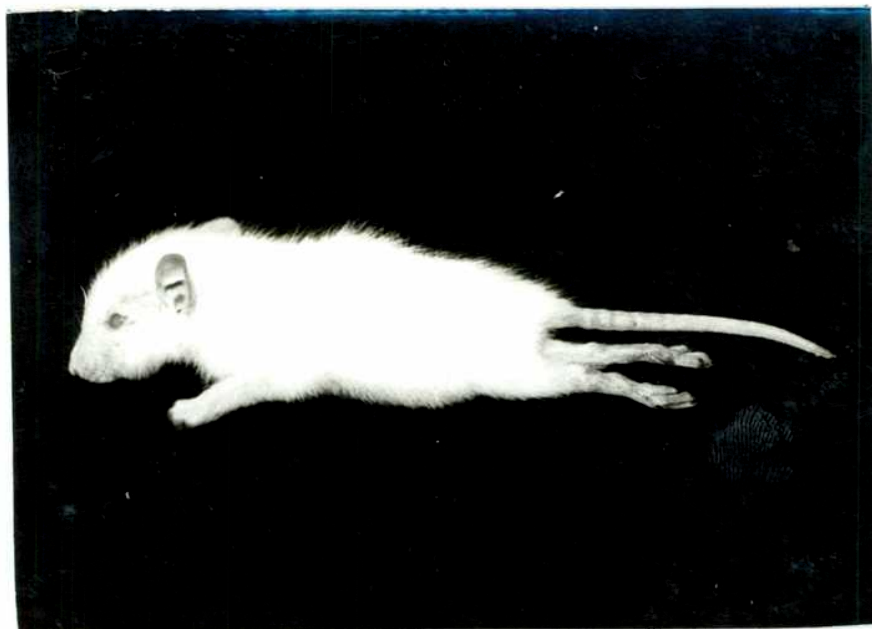


Foto 1b: Rata de la misma edad sin infectar.

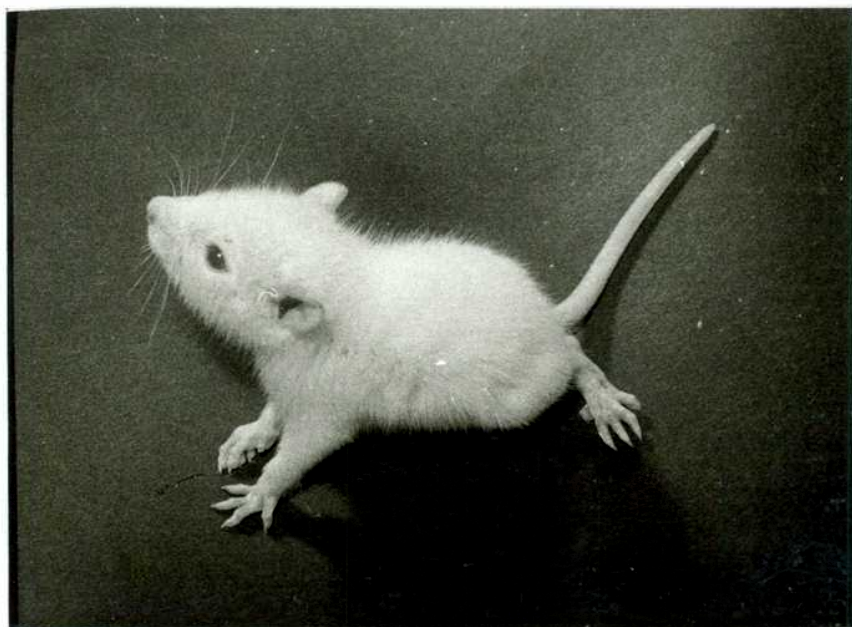


Tabla 1: Variación de la sensibilidad de ratas infectadas con diferentes dosis de VXJ^a

DL ₅₀	Número de animales	Porcentaje de mortalidad	Día promedio de muerte
10 ²	18	50	24,11
10 ³	16	93,75	21,6
10 ⁴	20	70	18,7
10 ⁵	19	63,15	19,25

a: Los animales de 2 días de edad fueron inoculados por vía ip con un volumen de 0,02 ml.

Tabla 2: Variación de la sensibilidad de ratas infectadas con diferentes dosis de VXJCl3^a

DL ₅₀	Número de animales	Porcentaje de mortalidad	Día promedio de muerte
10 ²	23	8,69	23
10 ³	20	10	20
10 ⁴	26	38,46	26
10 ⁵	22	13,63	22

a: Los animales de 2 días de edad fueron inoculados por vía ip con un volumen de 0,02 ml.

cual se incluye el número de animales utilizados. No se registraron diferencias importantes en cuanto a la sensibilidad de las ratas inoculadas con 10^2 , 10^3 y 10^5 DL₅₀ (entre un 9 y 13% de mortalidad), mientras que las que recibieron 10^4 DL₅₀ presentaron una mortalidad de casi el 40%.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se decidió realizar los restantes experimentos utilizando como dosis 10^3 DL₅₀ de cada una de las cepas.

4.4. AISLAMIENTO DE VIRUS

4.4.1. Titulación de virus por Unidades Formadoras de Placas (UFP)

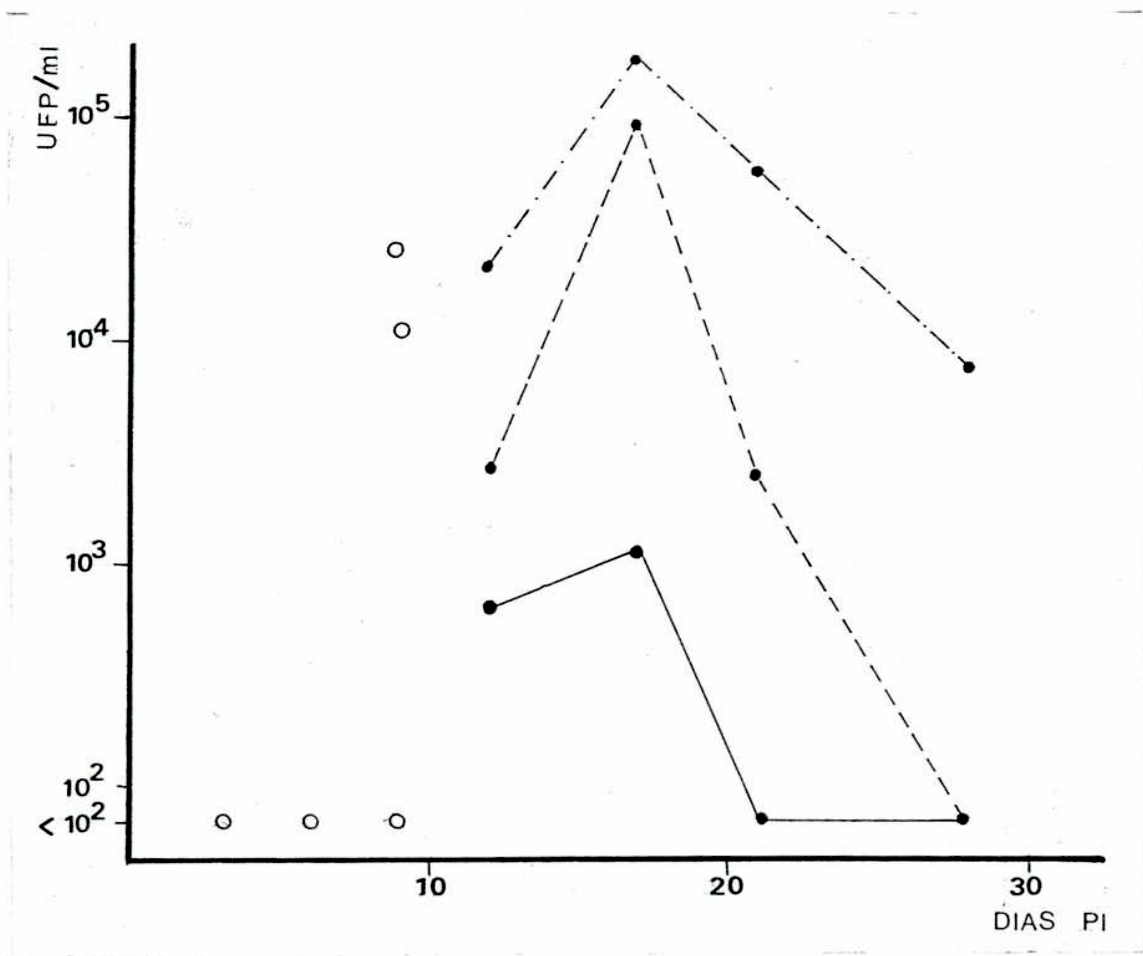
Ratas de 2 días de vida fueron infectadas con 10^3 DL₅₀ de cada una de las cepas por vía ip. A diferentes tiempos pi se les extrajo el cerebro, bazo, hígado y suero para titulación de virus. Se utilizaron 3 animales por tiempo y las muestras fueron procesadas individualmente.

4.4.1.1. VXJ:

Por medio de esta técnica no pudo aislarse virus en bazo, hígado y suero en los tiempos estudiados. Sin embargo, en cerebro se detectó multiplicación viral a partir del día 9 pi.

Como se observa en la Figura 10, el título de virus va

Figura 10: Título de virus en cerebro de ratas infectadas con VXJ^a.



- Animales que no presentan signos clínicos de enfermedad
 - - -●- - - Animales que presentan temblores y/o excitación
 - · - · -●- · - · Animales que presentan lateralización de la marcha y/o parálisis del tren posterior
 - Muestras obtenidas en el período previo a la aparición de signos clínicos
- a: Los animales de 2 días de edad fueron inoculados por vía ip con 10^3 DL_{50} en un volumen de 0,02 ml.

aumentando hasta los 17 días pi, cualquiera fuera el grado de enfermedad de los animales, alcanzando un título de $1,84 \times 10^5$ UFP/ml en las ratas más enfermas. A partir de ese momento los títulos comenzaron a disminuir paulatinamente.

Resulta de interés destacar que existe una relación directa entre los títulos de virus y el grado de morbilidad.

4.4.1.2. VXJC13:

De los órganos estudiados sólo se encontró virus en cerebro. Los resultados figuran en la Tabla 3, observándose una respuesta heterogénea en las muestras individuales.

Con la técnica utilizada, no se detectaron placas hasta los 10 días pi. En este tiempo, uno de los animales que mostraba signos de enfermedad alcanzó un título de $7,95 \times 10^4$ UFP/ml. El resto presentó valores del orden de 10^2 UFP/ml, título que se mantuvo a los 13 días pi, incrementándose en el día 17 pi y siendo no detectable a los 28 días pi.

4.4.2. Aislamiento de virus por la técnica de co-cultivo:

Animales de 2 días de vida fueron inoculados con 10^3 DL₅₀ de cada una de las cepas por vía ip y a diferentes tiempos pi se les extrajo cerebro, bazo, hígado y sangre, los cuales fueron co-cultivados con células Vero, para determinar en forma secuencial, la presencia de virus en dichos órganos y el acceso

Tabla 3: Título de virus en cerebro en ratas infectadas con VXJCL3^a

Día pi	UFP/ml
3	$< 1,25 \times 10^2$
	$< 1,25 \times 10^2$
	$< 1,25 \times 10^2$
6	$< 1,25 \times 10^2$
	$< 1,25 \times 10^2$
	$< 1,25 \times 10^2$
10	$7,95 \times 10^4$
	$6,25 \times 10^2$
	$2,75 \times 10^2$
13	$< 1,25 \times 10^2$
	5×10^2
	$1,25 \times 10^2$
17	5×10^2
	$2,75 \times 10^4$
	$< 1,25 \times 10^2$
21	$3,725 \times 10^4$
	$< 1,25 \times 10^2$
	$< 1,25 \times 10^2$
28	$< 1,25 \times 10^2$
	$< 1,25 \times 10^2$
	$< 1,25 \times 10^2$

a: Los animales de 2 días de edad fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml.

al SNC.

Fueron sacrificados 3 animales por tiempo y se procesaron "pooles" de las muestras.

4.4.2.1. VXJ:

En la Tabla 4, puede observarse que a los 2 días pi, los primeros órganos en los cuales es posible evidenciar replicación viral son el bazo y el hígado, persistiendo en dichos órganos hasta los 10 y 12 días pi respectivamente. A partir del 4° día pi, también se registró multiplicación en sangre y cerebro.

Estos resultados estarían indicando que la inoculación ip provocó una replicación viral en el bazo y en el hígado, a partir de lo cual se produjo una viremia prolongada llegando al cerebro, donde replica en forma extensiva.

4.4.2.2. VXJC13

Como se detalla en la Tabla 5, la replicación viral fue detectada en el bazo y en el hígado al día 4 pi, persistiendo en el último órgano hasta el día 6 pi. En el mismo día se registró multiplicación viral en sangre.

La presencia de virus en cerebro fue observada a partir del día 10 pi.

Tabla 4: Aislamiento de virus en órganos en ratas infectadas con VXJ
utilizando la técnica de co-cultivo^a

Días pi	O R G A N O S			
	Bazo	Hígado	Sangre	Cerebro
2	+	+	-	-
4	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
10	+	+	+	+
12	-	+	+	+
15	-	-	+	+
17	-	-	-	+
28	-	-	-	+

a: Los animales de 2 días de edad fueron infectados por vía
ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml.

Tabla 5: Aislamiento de virus en órganos en ratas infectadas con
VXJCl3 utilizando la técnica de co-cultivo^a

Días pi	M U E S T R A S			
	Bazo	Hígado	Sangre	Cerebro
2	-	-	-	-
4	+	+	-	-
6	-	+	+	-
10	-	-	-	+
12	-	-	-	+
15	-	-	-	+
17	-	-	-	+
28	-	-	-	+

a: Los animales de 2 días de edad fueron infectados
por vía ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml.

4.4.3. Detección de antígeno viral por inmunofluorescencia

Animales de 2 días de edad fueron inoculados por vía ip con 10^3 DL₅₀ de VJ y sacrificados a distintos tiempos pi extrayéndoles bazo y cerebro.

4.4.3.1. VXJ

En cerebro, a partir del día 10 pi, se evidenció la presencia de antígeno viral en neuronas corticales y subcorticales y en epitelio visceral de los plexos, así como en astrocitos en el día 23 pi. No se encontró antígeno en vasos y meninges.

La fluorescencia era de aspecto granular y de localización citoplasmática, como se describió previamente (138) (Foto 2).

Los materiales obtenidos de bazo resultaron negativos con excepción del día 15 pi, en los cuales se observaron focos mínimos de antígeno en células reticulares rodeando el centro germinativo.

Todos los resultados se describen en la Tabla 6.

4.4.3.2. VXJCl3

Como se observa en la Tabla 6, no pudo detectarse antígeno viral en bazo, en ninguno de los tiempos estudiados, mientras que en cerebro, se detectó focalizada y escasa expresión de antígeno en los días 10 y 15 pi en neuronas corticales.

Foto 2: Inmunofluorescencia indirecta de cerebro de una rata de 2 días de edad inoculada con VXJ por vía ip y sacrificada a los 15 días pi. Se observa antígeno Junín en neuronas corticales. 250 X.

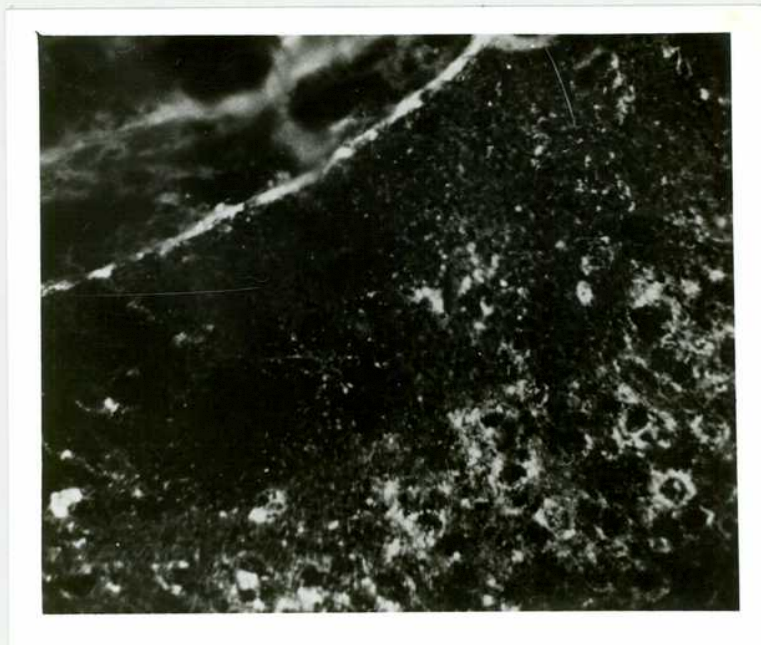


Tabla 6: Detección de antígeno viral por inmunofluorescencia en ratas infectadas con ambas cepas de VJ^a

Cepa de VJ	Días pi	Intensidad de fluorescencia	
		Cerebro	Bazo
VXJ	4	-	-
	7	-	-
	10	+++	-
	15	++++	+
	23	+++	-
VXJCl3	4	-	-
	7	-	-
	10	+	-
	15	+	-
	23	-	-

a: Los animales de 2 días de edad fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml.

4.5. TITULACION DE ANTICUERPOS

4.5.1. Anticuerpos neutralizantes (Ac Nt)

Los sueros correspondieron a los mismos animales utilizados para la obtención de muestras para titulación viral por UFP.

4.5.1.1. VXJ

La respuesta de Ac Nt está representada en la Tabla 7.

En general, las ratas menos enfermas presentaban un mayor título de Ac Nt. En los animales que no mostraban signos clínicos, los Ac Nt comenzaron a detectarse a los 12 días pi, con un título de 15, el cual fue aumentando a lo largo de la infección, alcanzando un máximo de 320 a los 28 días pi. En los animales con signos de enfermedad, los valores fueron menores y aparecieron recién a los 17 ó 21 días pi llegando a títulos de 120 a los 28 días pi.

4.5.1.2. VXJC13

Los títulos de Ac Nt fueron mucho menores en las ratas inoculadas con esta cepa comparados con las infectadas con VXJ.

Como muestra la Tabla 7, hasta el día 13 pi, no fue posible la detección de Ac Nt. Se obtuvo un título de 20 a los 17 días pi, alcanzando un valor de 40 a los 28 días pi.

Tabla 7: Título de anticuerpos neutralizantes en ratas infectadas con VJ^a

Día pi	VXJ	VXJC13 ^b
3	< 10 ^c < 10 < 10	< 10
6	< 10 < 10 < 10	< 10
9	< 10 < 10 < 10	NR ^d
10	NR	< 10
12	15 (0) ^e < 10 (1) < 10 (3)	NR
13	NR	< 10
17	20 (0) 20 (1) < 10 (3)	20
21	120 (0) 15 (1) 60 (3)	20
28	320 (0) 120 (1) 120 (3)	40

a: Los animales de 2 días de edad fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ de una u otra cepa contenidas en 0,02 ml.

b: Los títulos representan el promedio de las muestras obtenidas de 3 animales en cada tiempo.

c: Los títulos se expresan como la inversa de la máxima dilución que redujo el 50% de las UFP.

d: No realizado.

e: Las cifras entre paréntesis representan los diferentes grados clínicos de enfermedad (según Materiales y Métodos 3.15.).

4.5.2. Anticuerpos fijadores de complemento (Ac Fc)

Los sueros estudiados fueron los que se utilizaron para titulación viral por UFP.

4.5.2.1. VXJ

Los Ac Fc comenzaron a detectarse en el día 12 pi, con un título de 64, aumentando al día 17 pi hasta un título de 128 y manteniéndose relativamente constantes hasta el día 28 pi (Tabla 8). Los Ac Fc aparecieron concomitantemente con los Ac Nt, pero no se incrementaron en forma tan marcada a lo largo de la infección.

4.5.2.2. VXJC13

Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los Ac Fc empezaron a detectarse en el día 13 pi, con un título de 32, alcanzando un pico de 128 en el día 21 pi y disminuyendo (título: 32) en el día 28 pi.

Los títulos registrados fueron menores, al igual que los títulos de Ac Nt, a los obtenidos en animales infectados con VXJ.

4.5.3. Anticuerpos inmunofluorescentes (Ac IF)

4.5.3.1. VXJ

Comenzaron a aparecer en el día 12 pi con un título de

Tabla 8: Título de anticuerpos fijadores de complemento en ratas infectadas con VJ^a

Día pi	VXJ	VXJCl3 ^b
3	< 2 ^c	< 2
	< 2	
	< 2	
6	< 2	< 2
	< 2	
	< 2	
9	< 2	NR
	< 2	
	< 2	
10	NR ^d	< 2
12	64 (0)	NR
	64 (1)	
	64 (3)	
13	NR	32
17	120 (0) ^e	64
	128 (1)	
	NR (3)	
21	64 (0)	128
	64 (1)	
	128 (3)	
28	256 (0)	32
	128 (1)	
	128 (3)	

a: Los animales de 2 días de edad fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ de una u otra cepa contenidas en 0,02 ml.

b: Los títulos representan el promedio de las muestras obtenidas de 3 animales en cada tiempo.

c: Los títulos se expresan como la inversa de la máxima dilución que redujo la hemólisis en un 50%.

d: No realizado.

e: Las cifras entre paréntesis representan los diferentes grados clínicos de enfermedad (según Materiales y Métodos 3.15.)

32 aumentando a lo largo de la infección y alcanzando valores de 256 en el día 22 pi (Tabla 9).

4.5.3.2. VXJC13

Los títulos fueron menores a los obtenidos con VXJ alcanzando a los 28 días pi un título de 64 (Tabla 9).

4.6. TITULO DE Ac Nt EN RATAS DE DIFERENTES EDADES INOCULADAS CON VXJ

Tres animales de diferentes edades infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ de VXJ, fueron sacrificados a los 35 días pi.

En la Figura 11 se observa que las ratas sobrevivientes inoculadas a los 1; 2; 3 y 4 días de vida mostraron un título de 480, siendo éste de 240 cuando se infectaron al poseer 5 y 6 días de edad, disminuyendo a 120 en ratas de 7 días. Los grupos etarios de 10; 16 y 26 días presentaron un título de 80.

4.7. DETECCION DE INMUNOCOMPLEJOS

No fue posible la detección de inmunocomplejos en cerebro y bazo de animales infectados con VJ por vía ip.

4.8. ESTUDIOS DE ANATOMIA PATOLOGICA

Sólo en el cerebro fueron registradas alteraciones de importancia en determinados casos.

Tabla 9: Título de anticuerpos inmunofluorescentes en ratas infectadas con VJ^a

Día pi	VXJ ^b	VXJCl3
4	< 2 ^c	< 2
7	< 2	< 2
12	32	8
16	128	NR
22	256	16
28	NR ^d	64

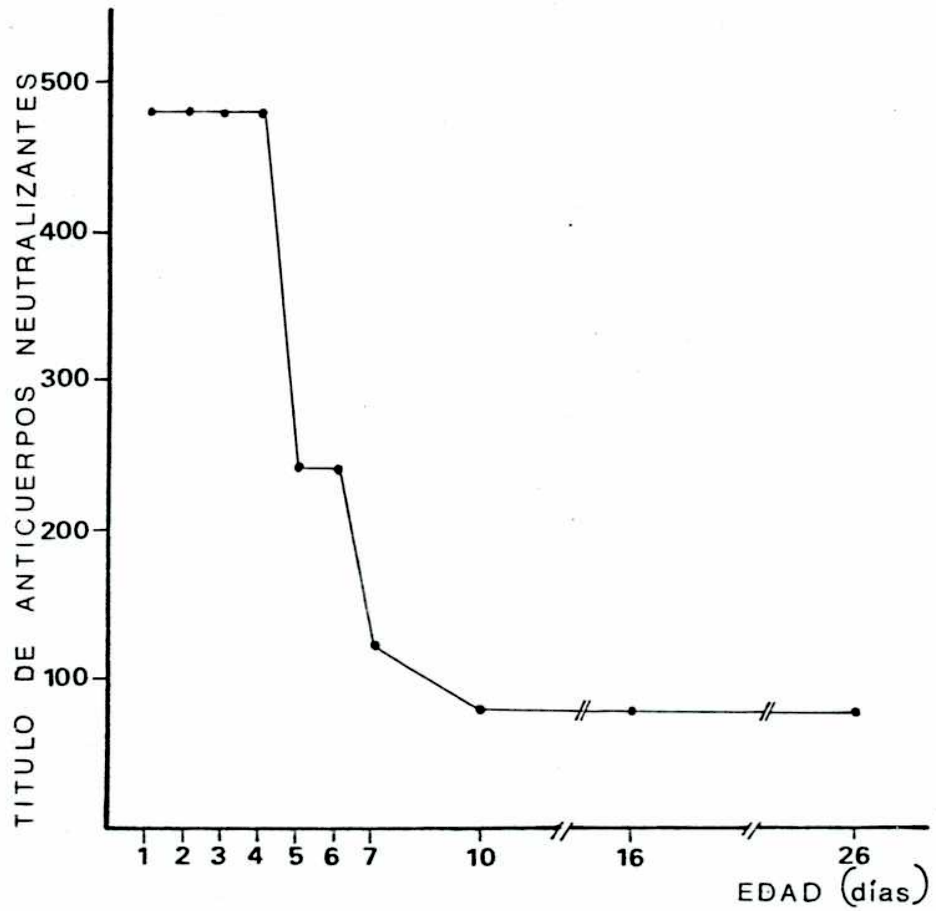
a: Los animales de 2 días de edad fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ de una u otra cepa contenidas en 0,02 ml.

b: Los títulos representan el promedio de las muestras obtenidas de 3 animales en cada tiempo.

c: Los títulos se expresan como la inversa de la máxima dilución que permitió la observación de fluorescencia.

d: No realizado.

Figura 11: Título de Ac Nt en ratas de distintas edades infectadas con VXJ^a.



a: Los animales fueron infectados por vía ip con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml y sacrificados a los 35 días pi. Los títulos se expresan como la inversa de la máxima dilución que inhibió el 50% de las UFP.

En la Tabla 10, se comparan los resultados observados para animales infectados con VXJ y VXJC13.

La observación más interesante para destacar es el infiltrado mononuclear meníngeo a los 21 días pi, presente en el cerebro de las ratas inoculadas con VXJ.

4.9. SENSIBILIDAD DE LA CEPA DE RATA ENDOCRIADA BUFFALO/SIM AL VJ

Con el fin de poder realizar ensayos de transferencia de células, se determinó la sensibilidad al VJ de esta cepa endocriada.

En la Tabla 11 se detalla en forma comparativa la susceptibilidad al VJ de las ratas Wistar y Buffalo/Sim, así como el número de animales utilizado.

Las ratas Buffalo/Sim de diferentes edades infectadas por las vías ip o ic con ambas cepas de VJ responden en forma similar que las ratas Wistar, pero con un comportamiento más homogéneo.

Los animales de 2 días de vida inoculados por vía ic con VXJ presentaron una mortalidad del 7,14%, siendo del 81,25% en ratas de 10 días de edad. Por el contrario, al ser inoculados por vía ip resultaron sensibles a los 2 días de vida (88% de mortalidad) y resistentes a los 10 días de edad.

Cuando las ratas fueron infectadas por vía ic con VXJC13

Tabla 10: Histopatología de órganos de ratas infectadas con VJ^a

Día pi	Cepa de virus	Cerebro		
		Meninges	Parénquima	Bazo
10	VXJ	+	N	N
		+++	+	N
		+	+	N
	VXJC13	++	N	N
		+	+	N
		+	N	N
15	VXJ	+	N	N
		+	N	N
		++	+	N
	VXJC13	+++	N	N
		+++	N	N
		+	N	N
21	VXJ	++++	N	N
		+++	N	N
		+++	+	N
	VXJC13	+	N	N
		+++	+	N
		+++	+	N
25	VXJC13	+	+	N
		+	N	N
	Control	+	N	N

a: Los animales de 2 días de edad fueron inoculados con 10^3 DL₅₀ por vía ip con un volumen de 0,02 ml.

Meninges	+ congestión	} Vascular
	++ congestión y hemorragia	
	+++ hemorragia	
	++++ infiltrado mononuclear	

Parénquima N: normal
+: focos de gliosis

Bazo N: normal

Tabla 11: Sensibilidad de ratas Wistar y endocriadas (Buffalo/Sim) al VJ^a

Edad	Cepa de virus	Vía	% Mortalidad	
			Wistar	Buffalo/Sim
2 días	VXJ	ic	6,66 (1/15) ^b	7,14 (1/14)
		ip	83,33 (25/30)	88 (44/50)
	VXJCl3	ic	92,31 (24/26)	100 (33/33)
		ip	12,5 (4/32)	8,11 (3/37)
10 días	VXJ	ic	95,24 (20/21)	81,25 (13/16)
		ip	0 (0/16)	0 (0/14)
	VXJCl3	ic	100 (13/13)	100 (9/9)
		ip	0 (0/9)	0 (0/8)
16 días	VXJ	ic	0 (0/12)	0 (0/10)
		ip	0 (0/15)	0 (0/8)
	VXJCl3	ic	0 (0/8)	0 (0/25)
		ip	0 (0/21)	0 (0/11)
26 días	VXJ	ic	0 (0/10)	0 (0/12)
		ip	0 (0/14)	0 (0/13)
	VXJCl3	ic	0 (0/13)	0 (0/18)
		ip	0 (0/16)	0 (0/17)

a: Los animales fueron inoculados con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml por vía ip.

b: Los números entre paréntesis representan la cantidad de animales muertos sobre el total utilizado.

tanto a los 2 como a los 10 días de vida, se obtuvo un 100% de mortalidad, mientras que por vía ip fueron resistentes (8,11 y 0% de mortalidad respectivamente).

Los animales de 16 y 26 días de edad resistieron la infección con ambas cepas, cualquiera fuera la vía utilizada.

4.10. ESTUDIOS REALIZADOS CON CELULAS MACROFAGICAS

4.10.1. Obtención de células adherentes a partir de exudado peritoneal

En la Tabla 12 se observan los porcentajes de las poblaciones celulares obtenidas a partir de exudado peritoneal de ratas Buffalo/Sim de 3 meses de vida, antes y después del tratamiento descrito en Materiales y Métodos (3.11.2.).

El 37% de las células de exudado peritoneal resultaron macrófagos y el 41% linfocitos. El resto correspondió a basófilos (8%) y polimorfonucleares (14%). En la Foto 3a puede observarse la presencia de 2 macrófagos, un polimorfonuclear y un linfocito.

La fracción de células adherentes presentó una viabilidad del 97%. Se registró un alto porcentaje de macrófagos (77%) con una contaminación del 5% de linfocitos. En la Foto 3b se observa un gran número de células macrofágicas, caracterizadas por sus granulaciones rojas.

Tabla 12: Porcentaje de distintas poblaciones celulares en exudado peritoneal de ratas adultas Buffalo/Sim^a

	Exudado peritoneal	Fracción adherente	Fracción no adherente
Macrófagos	37%	77%	6%
Linfocitos	41%	5%	73%
Polimorfo-nucleares	14%	15%	8%
Basófilos	8%	3%	13%

a: Las determinaciones se realizaron utilizando naranja de acridina.

Foto 3a: Células de la fracción no adherente obtenida a partir de exudado peritoneal de ratas adultas. Puede observarse la presencia de 2 macrófagos, un polimorfonuclear y un linfocito. 1000 X. Tinción con Naranja de Acridina.

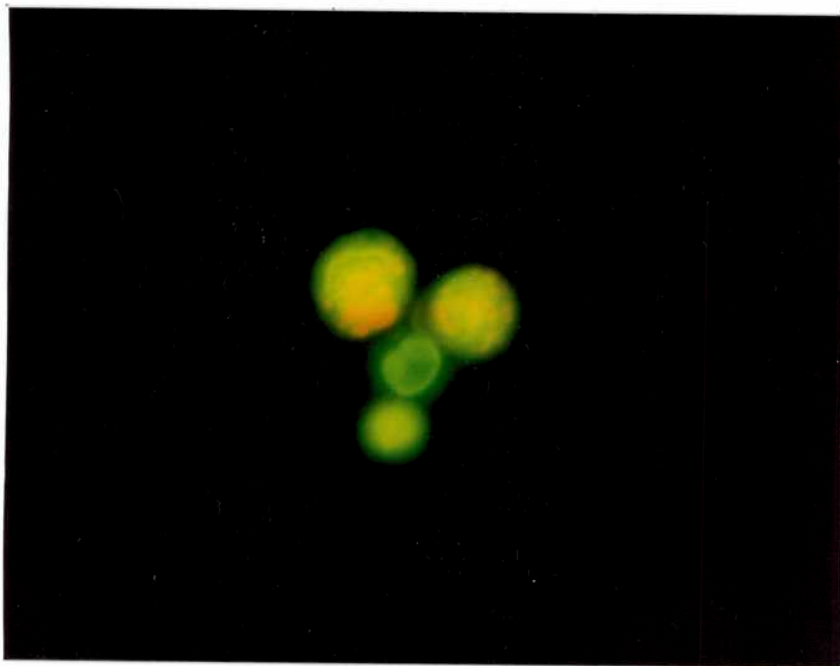
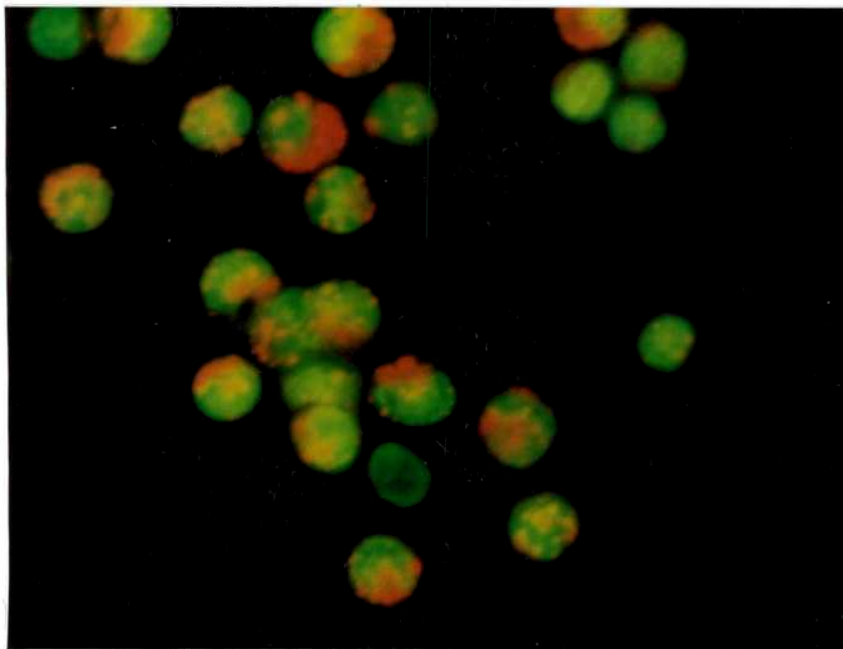


Foto 3b: Células de la fracción adherente obtenida a partir de exudado peritoneal de ratas adultas. Se observan gran cantidad de macrófagos con sus granulaciones características. 1000 X. Tinción con Naranja de Acridina.



Las células no adherentes se hallaban enriquecidas con linfocitos (73%) y el porcentaje de macrófagos en esta fracción fue del 6%.

4.10.2. Determinación de la capacidad macrofágica "in vitro" utilizando Staphylococcus aureus

Se obtuvo sangre y células de la cavidad peritoneal de ratas de 2 días de edad y de animales adultos inoculados con 10^3 DL₅₀ de VXJ o VXJCl3 por vía ipy de controles normales sin infectar.

Las muestras fueron recogidas en los días 5; 8; 11 y 16 pi en el caso de ratas de 2 días de vida y en los días 7; 15 y 23 pi a partir de animales adultos.

Los datos se expresan como el promedio de 3 animales por tiempo.

4.10.2.1. Medida de la capacidad fagocitaria de los elementos sanguíneos

La capacidad de fagocitar S. aureus por parte de células sanguíneas no se vio alterada por la infección con cualquiera de las dos cepas.

Los resultados se detallan en la Tabla 13. En ninguno de los tiempos estudiados se registraron diferencias significativas en el porcentaje de células de animales controles o infec

Tabla 13: Fagocitosis de células sanguíneas y peritoneales de ratas infectadas con VJ^a

Edad	Día pi	Cepa de virus	% Fagocitosis ^b	
			Células peritoneales	Células sanguíneas
2 días	5	VXJ	16,66 (p > 0,8)	9 (p > 0,1)
		VXJCl3	15,66 (p > 0,5)	10,66 (p > 0,5)
		Control	18	11,66
	8	VXJ	16,33 (p > 0,2)	11,66 (p > 0,9)
		VXJCl3	17 (p > 0,2)	10,66 (p > 0,5)
		Control	23,33	12,66
	11	VXJ	20 (p > 0,6)	15 (p > 0,2)
		VXJCl3	23,33 (p > 0,9)	12 (p > 0,8)
		Control	22,33	11,33
	16	VXJ	19,66 (p > 0,9)	16,66 (p > 0,9)
		VXJCl3	16,66 (p > 0,4)	17 (p > 0,5)
		Control	20	15,66
Adultos	7	VXJ	23,66 (p > 0,6)	14,33 (p > 0,5)
		VXJCl3	20,66 (p > 0,7)	19 (p > 0,9)
	15	VXJ	20,66 (p > 0,7)	15,33 (p > 0,3)
		VXJCl3	21 (p > 0,9)	17,33 (p > 0,6)
	23	VXJ	19,33 (p > 0,4)	19 (p > 0,9)
		VXJCl3	21 (p > 0,9)	16,33 (p > 0,4)
		Control	21,66	19

a: Los animales fueron inoculados con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml (2 días de edad) ó 0,2 ml (adultos) por vía ip.

b: Los datos se expresan como el promedio de 3 animales por tiempo.

tados, lactantes o adultos, que fagocitaron los estafilicocos.

En las ratas adultas, la fagocitosis de las células sanguíneas varió entre el 14,33 y 19% y en las lactantes, entre el 9 y 17% según el día en que fueron sacrificados los animales.

4.10.2.2. Medida de la capacidad fagocitaria de las células peritoneales

En la Tabla 13 se observa que las células peritoneales de los animales infectados presentaron una fagocitosis sin diferencias significativas con los controles normales. En las ratas adultas, la fagocitosis de las células obtenidas a partir de la cavidad peritoneal estuvo entre el 19,33 y 23,66%, mientras que en las lactantes varió entre el 15,66 y 23,33%.

4.10.3. Replicación del virus en los macrófagos

4.10.3.1. Determinación de centros infecciosos

Fueron utilizadas ratas de 2 días de vida y adultas infectadas con 10^3 DL₅₀ de cada una de las cepas de VJ por vía ip.

Las células peritoneales se obtuvieron a los días 1; 2; 3; 4; 6 y 11 pi. Las células adherentes se separaron según descrito en 3.11.2. de Materiales y Métodos y se determinó en ellas el número de centros infecciosos.

Los resultados presentados en la Tabla 14 indican que en los animales de 2 días de vida infectados con VXJ, se detectó replicación viral desde el primer día pi, siendo 10 veces superior a los 3 días pi, pero comienza a descender en forma pronunciada al día 4 pi.

En las ratas inoculadas con VXJCl3 la multiplicación viral fue menor que en las infectadas con la cepa patógena, resultando al tercer día pi alrededor de 30 veces menor que en los animales que recibieron VXJ. Los valores se mantuvieron relativamente constantes hasta el día 6° pi.

En las ratas adultas infectadas con una u otra cepa de virus, se detectaron mínimos centros infecciosos.

4.10.3.2. Detección de antígeno viral por inmunofluorescencia

Fueron obtenidas muestras de macrófagos peritoneales de ratas de 2 días infectadas por vía ip con ambas cepas de VJ.

Como se detalla en la Tabla 15, a los 4 y 7 días pi alrededor del 10% de las células adherentes obtenidas de animales infectados con VXJ presentaron antígeno viral citoplasmático (Foto 4). Por otra parte, en las ratas inoculadas con VXJCl3 sólo se detectó antígeno en la segunda semana pi en alrededor del 1% de las células.

4.10.4. Tratamiento con Si

Las partículas de Si de un tamaño aproximado de 0,5 a 10 μ

Tabla 14: Replicación viral en células peritoneales adherentes de ratas infectadas con VJ^a

Edad	Día pi	Cepa de virus	N° de placas ^b 10 ⁴ células
2 días	1	VXJ	46,66
		VXJC13	2,5
	2	VXJ	263,33
		VXJC13	1,9
	3	VXJ	566,66
		VXJC13	17,66
4	VXJ	48,33	
	VXJC13	39,25	
6	VXJ	6,25	
	VXJC13	46,25	
11	VXJ	0	
	VXJC13	0	
Adultos	1	VXJ	0
		VXJC13	0
	2	VXJ	0,3
		VXJC13	0,5
	3	VXJ	0,4
		VXJC13	0
6	VXJ	0	
	VXJC13	0	

a: Los animales fueron inoculados con 10³ DL₅₀ contenidas en 0,02 ml (2 días de edad) ó 0,2 ml (adultos) por vía ip.

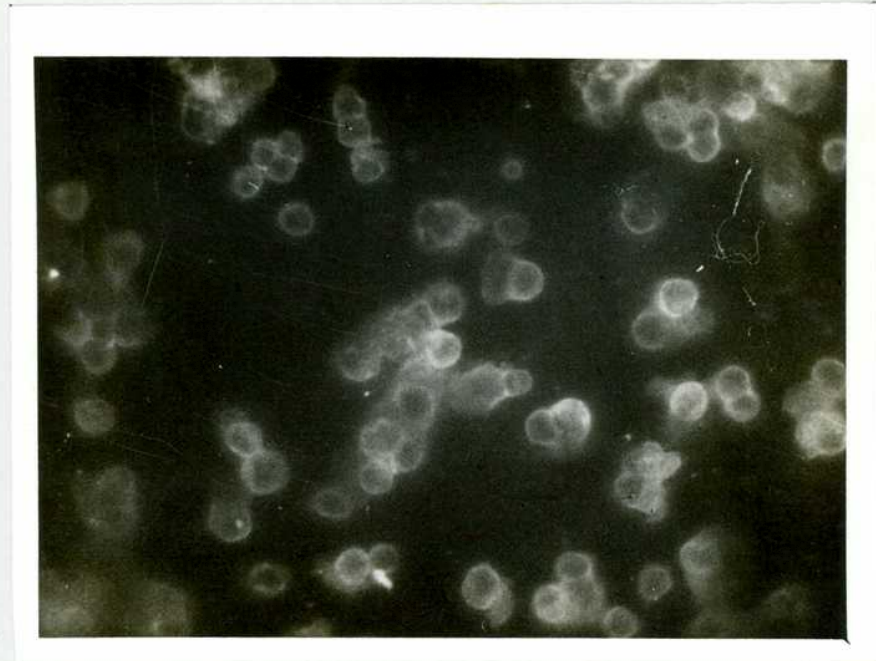
b: Los datos se expresan como el promedio de 3 animales por tiempo.

Tabla 15: Detección de antígeno viral por inmunofluorescencia en macrófagos de ratas infectadas con VJ^a

Días pi	Cepa de virus	% de células positivas
4	VXJ	(+) 10%
	VXJCl3	(-) 0%
7	VXJ	(+) 10%
	VXJCl3	(+) < 1%
10	VXJ	(-) 0%
	VXJCl3	(+) 1%
15	VXJ	(-) 0%
	VXJCl3	(+) 1%
23	VXJ	(-) 0%
	VXJCl3	(-) 0%

a: Los animales de 2 días de edad fueron inoculados con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml por vía ip.

Foto 4: Inmunofluorescencia indirecta de macrófagos peritoneales de ratas inoculadas a los 2 días de edad con VXJ y sacrificadas a los 4 días pi. Se observa presencia de antígeno Junín. 400 X.



al ser ingeridas por los macrófagos, los lesionan e inhiben su capacidad fagocitaria (139) (140).

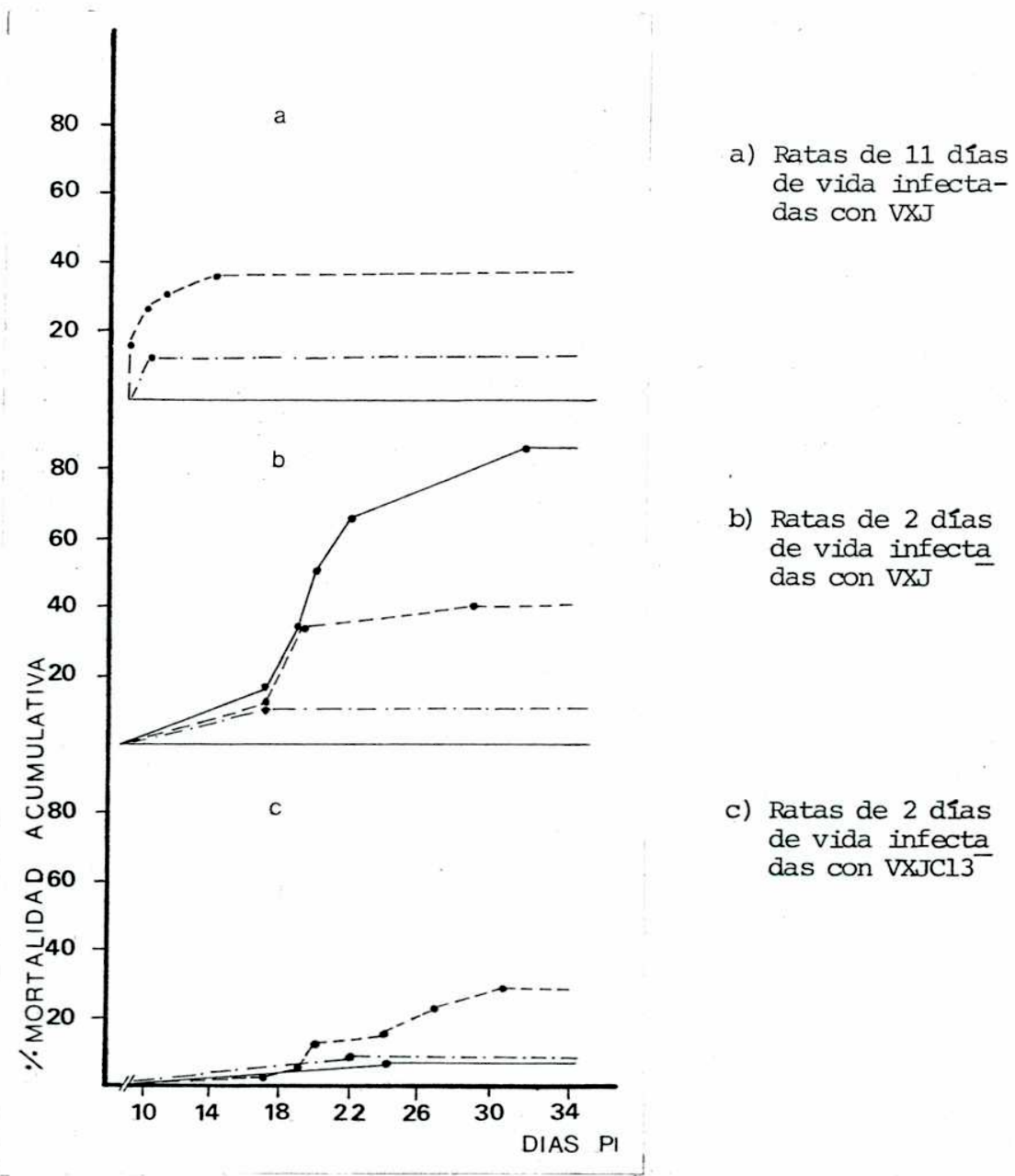
Para determinar la influencia de los macrófagos peritoneales en la infección de la rata por vía ip con VJ, se emplearon animales que resistían la infección viral: ratas de 11 días inoculadas con VXJ (53 animales) y de 2 días con VXJCl3 (33 animales), y sensibles: ratas de 2 días infectadas con VXJ (25 animales), a las que se inoculó 2 mg de Si/g de peso por vía ip 2 hs antes de la administración de 10^3 DL₅₀ de las cepas virales.

Los animales infectados y tratados, así como sus respectivos controles sin infectar y los que recibieron únicamente tratamiento con Si se controlaron diariamente durante un período de 35 días pi para determinar la mortalidad.

Como es posible observar en la Figura 12a, los animales de 11 días de vida inoculados con VXJ por vía ip, que son resistentes a la infección viral, presentaron una mortalidad del 35,85% al ser tratados con Si. En las ratas controles del mismo grupo etario que recibieron solamente Si, se registró una mortalidad del 11,11% mientras que los infectados sin tratamiento presentaron una sobrevivencia del 100%. Las diferencias fueron significativas (χ^2 : 12,71; p: 0,002).

En cuanto al grupo etario de 2 días infectado con VXJ

Figura 12: Administración de Si a ratas infectadas con VJ^a.



- Animales tratados con Si
- - - - Animales infectados y tratados con Si
- Animales infectados sin tratamiento

a: Los animales fueron inoculados con 10^3 DL₅₀ por vía ip. Dos horas antes de la infección fueron tratados con 2 mg de Si/g de peso por vía ip.

por vía ip, los resultados se detallan en la Figura 12b.

Cuando los animales fueron tratados con Si resultaron protegidos, ya que presentaron un 40% de mortalidad, siendo ésta del 83,33% para los controles (χ^2 : 12,03; p: 0,002).

La Figura 12c muestra los resultados obtenidos con ratas de 2 días de edad infectadas por vía ip con VXJCl3. Los animales inoculados con virus tuvieron un 6,6% de mortalidad, mientras que en los tratados con Si, ésta fue del 27,27%. Los controles que recibieron solamente Si presentaron una mortalidad del 7,14% (χ^2 : 4,38; 0,135 > p > 0,082).

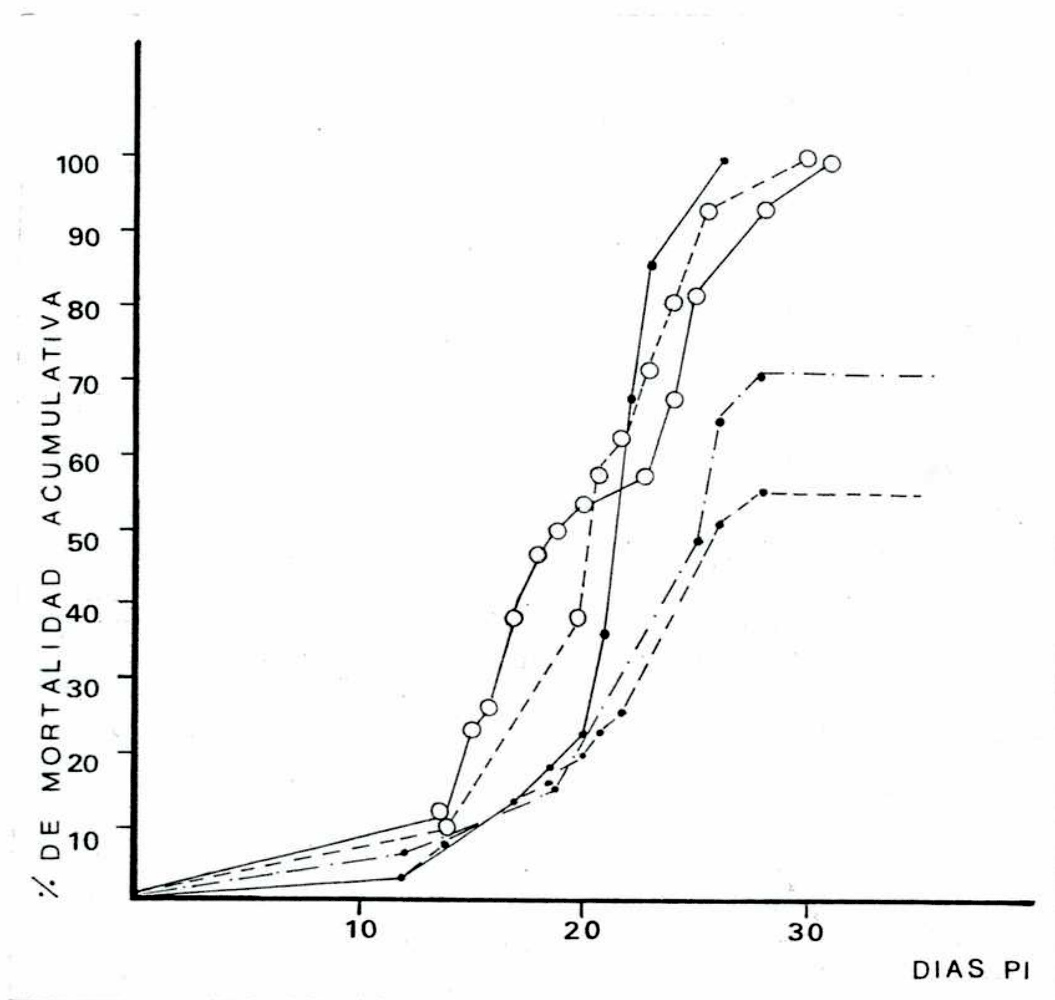
4.10.5. Transferencia pasiva de macrófagos

En un primer ensayo, fueron transferidas células totales de exudado peritoneal de ratas adultas de 3 meses de vida a lactantes. Las células se obtuvieron según se describió en Materiales y Métodos (3.11.1.), se llevaron a concentraciones de 5×10^5 y 5×10^6 células/ 0,1 ml, siendo luego administradas por vía ip a ratas de un día de edad. Estas últimas fueron infectadas 24 hs más tarde con 10^3 DL₅₀ de VXJ por vía ip.

La mortalidad fue registrada durante 35 días. Se utilizaron 30 animales como controles de infección viral, 33 que recibieron 5×10^6 células y 14 con 5×10^5 células.

En la Figura 13 se observa que la mortalidad de los ani

Figura 13: Efecto de la transferencia de células de exudado peritoneal a ratas infectadas con VXJ^a.



- Control de animales infectados
- - -● Animales infectados y transferidos con 5×10^5 células
- ...● Animales infectados y transferidos con 5×10^6 células
- - -○ Animales infectados y transferidos con 1×10^6 células no adherentes
- Animales infectados y transferidos con 1×10^6 células adherentes

a: Los animales de 1 día de vida recibieron la transferencia de células por vía ip y 24 hs más tarde se infectaron con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml por vía ip.

males inoculados con VXJ fue del 100% y disminuyó al recibir células peritoneales de animales adultos previamente a la infección viral.

Es interesante destacar la importancia de la concentración celular transferida, ya que con 5×10^6 la mortalidad fue del 54,83% (χ^2 : 13,49; $p < 0,001$), mientras que utilizando 5×10^5 células alcanzó el 71% (χ^2 : 2,77; $0,157 > p > 0,083$).

Con el fin de determinar cuál de las poblaciones celulares era la responsable de la protección se usaron células adherentes y no adherentes separadas según se describió en Materiales y Métodos (3.11.2.).

Se utilizaron 30 animales como controles inoculados con virus; 33 que recibieron 1×10^6 células adherentes y 17 transferidos con 1×10^6 células no adherentes.

Como se observa en la Figura 13, ninguna de las poblaciones administrada por separado, pudieron proteger a los animales de la acción viral.

4.10.6. Transferencia de células de exudado peritoneal de animales infectados

Ratas de 2 días de vida fueron infectadas por vía ip con 10^3 DL₅₀ de VXJ. A los 2 días pi se obtuvieron las células peritoneales según se describió en Materiales y Métodos (3.11.1.).

Las mismas fueron lavadas 3 veces con medio de crecimen-

to y adsorbidas una hora a 37° C con suero de rata anti VJ (Materiales y Métodos 3.12.) para asegurar que no existiera virus en el sobrenadante.

Las células transferidas provocaron enfermedad y muerte en los animales receptores de 2 días de vida. El porcentaje de mortalidad estuvo relacionado con el número de células transferidas, como se observa en la siguiente Tabla:

N° de células transferidas	% de mortalidad	N°de animales utilizado
$2,0 \times 10^5$	57,1	28
$3,0 \times 10^5$	88,8	19
$3,5 \times 10^5$	100	25

4.11. TRANSFERENCIA PASIVA DE IS

Ratas de 2 días de vida fueron inoculadas por vía ip con 10^3 DL₅₀ de VXJ. Los animales fueron divididos en tres lotes, de los cuales uno, constituido por 24 ratas, recibió sólo la infección viral; otro, (54 animales) fue inoculado además con IS (título: 80) y el tercero con IS cuyo título fue de 320 (33 animales).

El IS fue administrado en 4 dosis de 0,1 ml cada una por vía ip en los días 0; 2; 4 y 6 pi.

La Figura 14 muestra que los animales no fueron protegidos por el IS cuando éste poseía un título de 80, ya que la mortalidad de los mismos fue del 74,07%, mientras que en los animales que recibieron únicamente la infección viral, ésta fue del 75% ($\chi^2:0,009$; $p > 0,317$). Por el contrario, las ratas transferidas con IS con un título de 320, presentaron una mortalidad del 45,45% ($\chi^2: 4,56$; $0,046 > p > 0,025$).

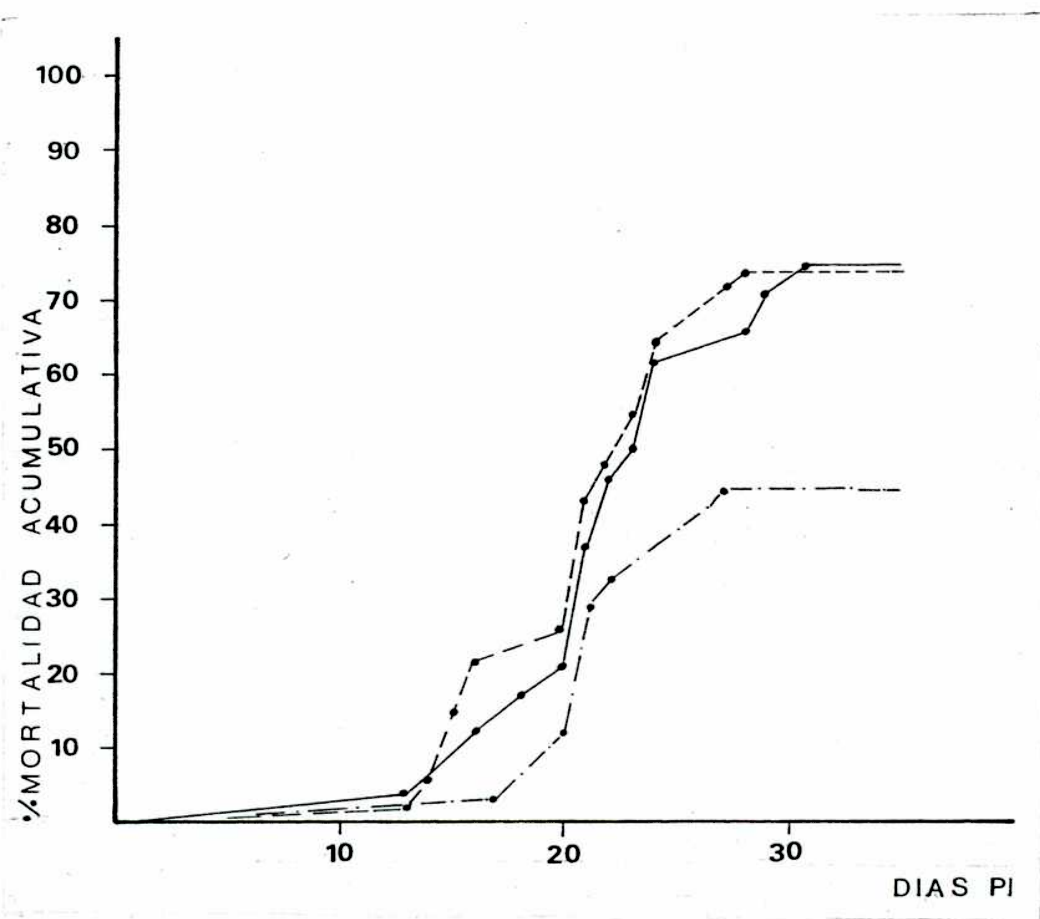
4.12. ESTUDIOS DE PROTECCION CRUZADA ENTRE LAS CEPAS DE VJ

Ratas de 2 días de vida inoculadas por vía ip con 10^3 DL₅₀ de VXJC13 fueron desafiadas con 10^3 DL₅₀ de VXJ por vía ic a los 7; 8; 9; 10; 11 y 12 días de edad, período en el cual los animales son sensibles a la infección ic.

La inoculación de ratas de 2 días con VXJC13 no las protegió frente a una descarga con VXJ a los 7; 8 y 9 días de vida (5; 6 y 7 días después de la infección con VXJC13), aunque en el último de los tiempos mencionados se registró un retraso en la mortalidad.

La Figura 15a muestra que cuando los animales fueron desafiados con VXJ a los 10 días de edad (8 días luego de la inoculación con VXJC13), la mortalidad disminuyó con respecto a los controles sin protección (58,1% versus 94,7%) ($\chi^2:20,48$; $p < 0,0005$) y resultó retrasada con un día promedio de muerte de 16,1 y 12,5 respectivamente.

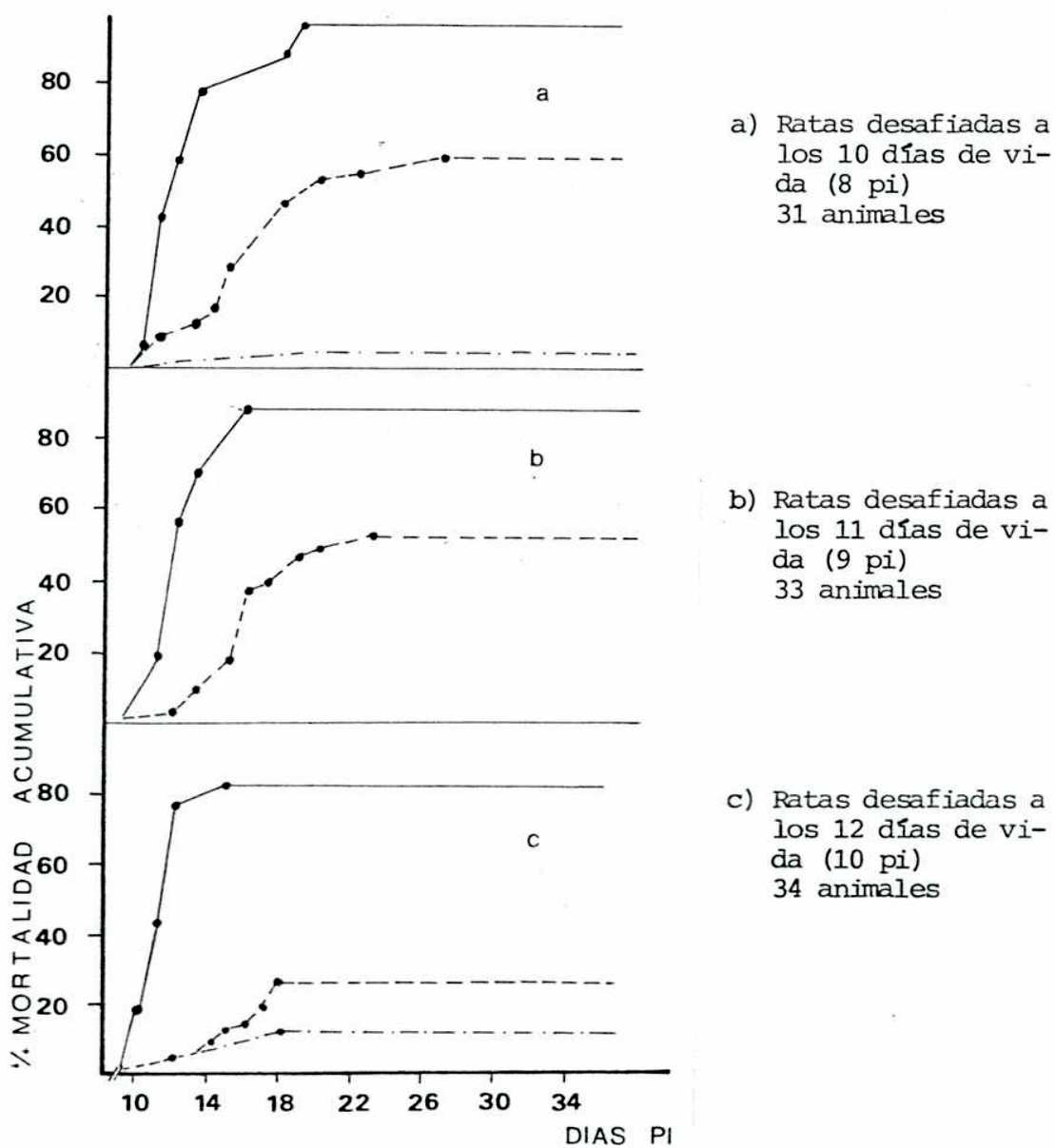
Figura 14: Transferencia de IS a ratas infectadas con VXJ^a.



- Control de animales infectados
- Animales infectados y tratados con IS (título:80)
- .-.-●-.-.- Animales infectados y tratados con IS (título:320)

a: Los animales de 2 días de edad fueron inoculados con 10^3 DL₅₀ contenidas en 0,02 ml por vía ip. En los días 0;2; 4 y 6 pi se administraron 0,1 ml de IS por vía ip.

Figura 15: Protección cruzada de ratas con dos cepas de VJ^a.



- Animales infectados con VXJCl3
- Animales infectados con VXJ
- Animales infectados con VXJCl3 y desafiados con VXJ

a: Los animales de 2 días de edad fueron inoculados con 10^3 DL₅₀ de VXJCl3 por vía ip y a diferentes tiempos pi desafiados con 10^3 DL₅₀ de VXJ por vía ic.

Los animales que recibieron la descarga a los 11 días de vida (Figura 15b), es decir, 9 días luego de la inoculación con VXJCl3, fueron protegidos en mayor grado, siendo la mortalidad del 51,4% versus 87,5% (χ^2 : 18,97; $p < 0,0005$) y los días promedio de muerte : 16,2 y 12,8 respectivamente.

El mayor grado de protección fue obtenido cuando la edad de los animales fue de 12 días (10 días después de la infección con VXJCl3) siendo la mortalidad del 26,5% (χ^2 : 24,77; $p < 0,0005$) (Figura 15c).

Este último esquema experimental fue utilizado para determinaciones de título de virus en cerebro.

Los datos expresados en la Tabla 16 muestran que los animales infectados con VXJCl3 y desafiados con VXJ no presentaron título de virus en cerebro detectado por UFP en ninguno de los tiempos estudiados.

Las ratas controles inoculadas con VXJCl3 por vía ip poseyeron títulos moderados a los 13 y 18 días pi desapareciendo a los 23 días pi (25 días de vida).

Los animales que recibieron VXJ por vía ic a los 10 días de vida mostraron altos títulos desde los 5 hasta los 15 días pi.

Tabla 16: Título de virus en cerebro de ratas infectadas con VXJCl3 y desafiadas con VXJ^a

Días de vida	Grupo I ^b	Grupo II	Grupo III
15	$< 1,25 \times 10^{2c}$	$7,94 \times 10^2$	1×10^4
20	$< 1,25 \times 10^2$	$6,6 \times 10^2$	$2,52 \times 10^5$
25	$< 1,25 \times 10^2$	$< 1,25 \times 10^2$	$3,98 \times 10^5$

Grupo I : Animales infectados con VXJCl3 y desafiados con VXJ.

Grupo II : Animales infectados con VXJCl3.

Grupo III: Animales infectados con VXJ.

a: Los animales de 2 días de edad fueron inoculados con 10^3 DL₅₀ de VXJCl3 por vía ip y a los 10 días pi fueron desafiados con 10^3 DL₅₀ de VXJ por vía ic.

b: UFP/ml.

c: Los títulos representan el promedio de las muestras obtenidas de 3 animales en cada tiempo.

5. DISCUSION

Estudios realizados hasta el presente utilizando a la rata como huésped de experimentación para el estudio de la FHA, demostraron que la misma tiene un comportamiento diferente según la edad y la cepa de virus utilizada, variando también su susceptibilidad según la vía de infección (60) (62).

El objetivo del presente trabajo fue el estudio exhaustivo de la infección de la rata por vía ip con virus Junín, intentando determinar los mecanismos por los cuales una infección extraneural es capaz de desarrollar una enfermedad neurológica.

La diseminación del virus en el organismo juega un papel crítico en la habilidad que tiene una cepa viral en alcanzar el órgano blanco. Es sabido, que aunque numerosos virus son altamente virulentos cuando se inoculan directamente en el tejido cerebral, carecen, aparentemente, de factores necesarios para que se produzca una distribución exitosa desde los sitios de infección periférica hacia el SNC. Estos factores incluirían una importante replicación periférica, una entrada y distribución neural y una evasión a las defensas inmunológicas.

En lo que respecta a la sensibilidad de los animales de diferentes edades a la infección ip con VXJ, las ratas de 2

días de vida resultaron ser las más susceptibles presentando una mortalidad del 84,13% (Figura 9) con evidentes signos neurológicos.

En el grupo etario de 3 días, a pesar de presentar un considerable grado de enfermedad, la mortalidad fue sólo del 34,62%. La morbimortalidad continuó decreciendo concomitantemente con el aumento de la edad, ya que los animales de 4 y 5 días presentaron una elevada sobrevida y escasos signos de enfermedad y a partir de los 6 días este huésped resistió la infección por vía ip con VXJ (Figura 9).

Merece subrayarse la estrecha correlación entre la aparición de los signos clínicos de enfermedad y la mortalidad de los animales.

De las investigaciones realizadas se puede afirmar que las ratas de 2 días de edad son las más sensibles a la acción de VXJ, presentando los máximos grados de morbimortalidad.

Durante el corto tiempo en el cual un animal se desarrolla, los cambios fisiológicos que acompañan a la maduración disminuyen la susceptibilidad a infecciones virales. Los estudios realizados por Sigel en 1952 (141) demostraron que se producía un incremento de la resistencia asociado con la edad del huésped para un gran número de infecciones virales. Este aumento de la resistencia en función de la edad, ha sido observado en gran cantidad de modelos experimentales como en

ratones infectados con VJ por vía ic (41), en ratas y ratones con virus West Nile (142), en ratones inoculados con virus Sindbis por vía ic (143) y con coronavirus (144) (145) (146).

La rata infectada con VXJCl3 por vía ic es susceptible desde el nacimiento hasta los 12 días de vida (62). En cambio, los datos presentados en el presente trabajo muestran que la inoculación ip con esta cepa provoca una mortalidad de alrededor del 15% sólo cuando los animales tienen entre 1 y 3 días de edad, siendo luego resistentes a la infección viral (Figura 9).

Lo observado en el modelo rata-VXJCl3, es comparable a los resultados obtenidos por Lodmell (147) con el virus rábico, quien demuestra que cepas de ratones resistentes a la infección viral por vía ip eran susceptibles a la inoculación ic, estando bajo control genético la resistencia a la inoculación ip. Datos similares fueron presentados trabajando con ratones infectados con virus West Nile (142), en los cuales la sensibilidad con respecto a la edad disminuye levemente tras una inoculación ic, y en forma muy rápida por vía ip, a pesar del neurotropismo de este virus, el cual invade el SNC (148). Además, Sorensen y col. (149) observaron que ratas de diferentes cepas eran sensibles a la infección ic con la cepa JHM de MHV, mientras que resisten la infección ip.

Sin embargo, trabajos realizados con retrovirus murinos (150) y coronavirus (151) demostraron que los ratones eran sensibles tanto a la inoculación por vía ip como ic durante los primeros días de vida.

De acuerdo a lo descripto, la rata de 2 días de edad infectada con VJ por vía ip, puede ser utilizada como marcador de virulencia para diferenciar cepas patógenas y atenuadas, ya que VXJ provoca alrededor del 85% de mortalidad, mientras que VXJC13 sólo el 15%.

Los factores que influyen para que una cepa se comporte como virulenta o atenuada cuando penetra intraperitonealmente, serían su capacidad de replicar en los macrófagos peritoneales y de distribuirse llegando al órgano blanco.

Como las ratas de 2 días de vida fueron las que presentaron la mayor diferencia de mortalidad, se utilizó a este grupo etario para profundizar los mecanismos por los cuales el virus tiene acceso al SNC causando la patología observada. Primero se estableció la dosis adecuada para mantener la diferencia entre ambas cepas, comprobando que 10^3 DL₅₀ era la más conveniente en animales infectados con VXJ, ya que 10^2 DL₅₀ provocaba sólo un 50% de mortalidad, obteniendo también porcentajes relativamente bajos con 10^4 y 10^5 DL₅₀ (Tabla 1). La menor susceptibilidad obtenida con 10^2 DL₅₀ podría deberse

al menor número de partículas virales administradas, mientras que el menor porcentaje de mortalidad observado con 10^5 DL₅₀ se debería a interferencia por una alta concentración de partículas virales, como fue observado previamente en ratas (62) y ratones (41) infectados con VJ.

Los ensayos realizados infectando animales con distintas dosis de VXJCl3, demostraron que la mortalidad fue similar en todos los casos, con excepción del grupo que recibió 10^4 DL₅₀ (Tabla 2).

Con respecto al aislamiento viral en órganos, éste fue siempre mayor en ratas inoculadas con VXJ con respecto a las infectadas con VXJCl3 por cualquiera de los métodos empleados.

Utilizando la técnica de UFP, sólo pudo detectarse replicación viral en cerebro.

En los animales infectados con VXJ se observó multiplicación a partir del día 9 pi alcanzando un pico a los 17 días pi, disminuyendo los valores a lo largo del período de infección (Figura 10).

Resulta de interés señalar que los títulos de virus fueron siempre más elevados en los animales con mayor grado de enfermedad. Esto es similar a lo demostrado en ratones infectados por vía ic con una cepa neurovirulenta de MHV, ya que animales enfermos presentaron altos títulos de virus en cerebro,

mientras que en los asintomáticos, no fue detectado virus infeccioso (145). Además, en la infección de ratones lactantes con virus Sindbis, la resistencia de los mismos estuvo acompañada por una disminución del título de virus en cerebro (143).

En los animales infectados con VXJCl3 los títulos de virus fueron menores, apareciendo alrededor de los 10 días pi y alcanzando el máximo a los 17 días pi (Tabla 3).

Estos resultados son comparables a lo demostrado con VJ en cobayos (26) (28) y primates (58), en los cuales las cepas atenuadas replican en los tejidos en forma más restringida que la patógena. Además, administrando virus de Influenza por vía intranasal en ratas recién nacidas, se observó que la infección con cepas virulentas provocó una mayor replicación viral en el sistema respiratorio que las cepas atenuadas (152).

Es necesario destacar el hecho que en la rata de 2 días de edad, que es sensible a la infección ic con VXJCl3 pero resistente a VXJ, la cinética y concentración de ambas cepas en cerebro fue similar (62) (64) (66). Por el contrario, utilizando la vía ip, la multiplicación viral se correlacionó con la susceptibilidad o resistencia a la infección. Además, en este modelo, el grado de enfermedad depende de la mayor o menor replicación viral en cerebro, ya que cuanto más elevado fue el título de virus, más severos fueron los signos de enfermedad presentados por los animales, lo que también ha sido observado en

otras infecciones virales (153).

Ya ha sido señalado que la rata de 10 días de vida es sensible a la inoculación ic con VJ, alcanzando un título máximo de virus en cerebro a los 7 días pi (60). En los animales de 2 días de edad infectados con VXJ por vía ip, el título de virus en cerebro alcanza un pico a los 17 días pi, lo que coincide con el momento en el cual el título es máximo en las ratas de 10 días inoculadas ic: 7 pi. Además, los signos neurológicos presentados por ambos grupos son similares. Por lo tanto, sería posible que el mecanismo que lleva al desarrollo de la enfermedad en ambos modelos sea similar. Por otra parte, en las ratas de 2 días de edad inoculadas ip con VXJC13, la cantidad de virus que llega al SNC es mucho menor y no sería suficiente para provocar enfermedad.

El rescate de virus utilizando la técnica de cocultivo, cuya sensibilidad es muy superior a la del método convencional, demostró que en los animales infectados con VXJ, hubo una replicación sostenida en hígado y bazo, seguida de viremia prolongada y persistente multiplicación viral en cerebro (Tabla 4). Por el contrario, en ratas infectadas con VXJC13, la presencia viral fue fugaz en hígado y bazo, la viremia breve y la multiplicación viral en cerebro registrada recién a partir del día 10 pi (Tabla 5).

Los resultados indican que la mayor neuropatogenicidad de VXJ estaría dada por una mayor capacidad de replicación de esta cepa en bazo e hígado, dando lugar a una prolongada viremia que facilita el acceso al SNC.

Brooks y col. (150) demostraron que la invasión del SNC luego de la infección ip de ratones con retrovirus murino, tuvo origen como resultado de la diseminación por vía hemática, ya que la viremia y la multiplicación viral en bazo precedieron el crecimiento exponencial en cerebro.

Estudios realizados con HSV, demostraron que tras una inoculación por vía ip, el virus alcanzó el SNC por caminos hematológicos y neurológicos (114) (154).

También pudo ser demostrado para la infección por vía ip de ratones lactantes con coronavirus, alta recuperación de virus en cerebro, resultando infectados además el cordón espinal, la raíz dorsal del ganglio y retina. Sin embargo, no hubo crecimiento viral en tejidos no neurales, lo que implicaría un acceso al SNC por caminos neurológicos (151).

Carrigan y col. (153), utilizando hamsters infectados con virus de sarampión por vía ip, observaron una interrelación entre la encefalitis provocada por la infección viral con la diseminación en pulmón, riñón y bazo, así como en cerebro.

Los experimentos para detección de antígeno viral con inmunofluorescencia se correlacionan con los resultados obtenidos utilizando las técnicas detalladas anteriormente. En ratas infectadas con VXJ pudo detectarse antígeno en bazo en el día 15 pi, observándose sólo focos mínimos de antígeno en células reticulares rodeando el centro germinativo. En cerebro se evidenció antígeno viral a partir del día 10 pi en neuronas corticales y subcorticales y epitelio visceral de los plexos, así como en astrocitos en el día 23 pi (Tabla 6). La fluorescencia fue de localización citoplasmática y de aspecto granular, como fue descrito previamente (138).

Los animales infectados con VXJCl3 presentaron antígeno viral solamente en cerebro, observándose una moderada expresión de antígeno en neuronas corticales en los días 10 y 15 pi,

En cuanto a la respuesta inmunológica humoral, las experiencias realizadas demuestran que VXJ induce una mayor síntesis de Ac Nt, Ac Fc y Ac IF que VXJCl3.

Las ratas inoculadas con VXJ, presentaron títulos más altos de Ac Nt cuanto menores eran los grados clínicos de enfermedad. En animales no enfermos los Ac Nt comenzaron a detectarse a los 12 días pi y los valores se incrementaron a lo largo de la infección, mientras que en las ratas con evidentes signos de enfermedad, aparecieron a los 17 o 21 días pi

(Tabla 7).

Comparando los resultados obtenidos de Ac Nt y de aislamiento viral, surge que el grado de enfermedad se correlaciona con el título de virus en cerebro y la menor cantidad de Ac Nt.

Este efecto causado por la cepa patógena puede ser debido a varios factores:

a) Una posibilidad, sería que en los animales capaces de producir una buena respuesta de anticuerpos, éstos neutralicen gran parte del virus y por ello la morbimortalidad sea menor comparada con los que no han podido desarrollar una inmunidad humoral satisfactoria.

La observación de desaparición secuencial de virus y aparición de anticuerpos en infecciones virales no letales, sugirió que la respuesta humoral podría estar involucrada en controlar la viremia y permitir la recuperación de una infección aguda. Algunos autores sostienen que los anticuerpos disminuirían la dispersión del virus al SNC, como ocurre con HSV (155) (156).

La capacidad de los anticuerpos de neutralizar al virus antes de que éste alcance al órgano blanco fue demostrada para gran cantidad de infecciones virales (90) (155) (156) (157) (158) (159), mientras que en otros casos también juega un pa-

pel importante la inmunidad mediada por células (137) (160) (148).

b) Como fue mencionado anteriormente, en las ratas con una replicación viral muy elevada, los grados clínicos de enfermedad fueron más severos, lo cual podría comprometer su sistema inmune dando lugar a una disminución en la formación de anticuerpos y por ende, una mayor mortalidad. Ensayos recientes (161) apoyan esta hipótesis, ya que demuestran una depresión de la respuesta humoral hacia antígenos heterólogos en ratas de 2 días infectadas con VXJ por vía ip.

Ha sido claramente comprobada una inhibición de la respuesta inmune debida a una infección viral (162) (163), como sucede en cobayos infectados con VJ (31) (32) (38) (39), así como en ratones inoculados con LCM (164).

c) También podrían formarse inmunocomplejos, lo que daría como resultado una disminución en el título de anticuerpos circulantes. En ratones persistentemente infectados con LCM se pudieron detectar anticuerpos no neutralizantes en forma de inmunocomplejos que son depositados en el riñón provocando glomerulonefritis (165).

En cuanto a los animales inoculados con VXJC13, los títulos de Ac Nt fueron bajos y detectados tardíamente (Tabla 7). Esto sería debido a una pobre replicación viral, siendo la

masa antigénica insuficiente como para estimular el aparato inmunocompetente.

Los Ac Fc aparecieron simultáneamente con los Ac Nt pero como se mantuvieron en forma constante, no guardaron relación con el grado de enfermedad.

Notkins (166) ha sugerido que un aumento desproporcionado de anticuerpos no neutralizantes serían capaces de bloquear la efectividad de los Ac Nt sintetizados. Esto podría ocurrir en el modelo rata-VJ, ya que a pesar de la presencia de Ac Nt, los animales con severo grado de enfermedad sucumben a la infección.

Los Ac Fc y Ac IF presentaron menores títulos en los animales infectados con VXJCl3 y se ha sugerido que este tipo de anticuerpos no conferirían protección ni neutralizarían al virus (167).

Los animales infectados a diferentes edades por vía ip con VXJ que sobrevivieron, presentaron a los 35 días pi mayores títulos de Ac Nt cuanto menor edad tenían al ser inoculados (Figura 11). El antígeno viral provocaría una mayor respuesta cuando el animal es más sensible, debido, quizás, a una mayor replicación.

No se detectó la presencia de complejos antígeno-anti-

cuerpo en bazo y en cerebro de ratas infectadas con VJ. Esto descartaría la posibilidad de que la patogenia de la enfermedad sea debida a la presencia de inmunocomplejos que fueran los responsables de una disminución en el título de anticuerpos neutralizantes.

Los estudios de anatomía patológica demostraron la existencia de un infiltrado mononuclear meníngeo en el cerebro de las ratas inoculadas con VXJ, lo que estaría indicando que la muerte de los animales se debería a una encefalitis, la cual podría ser debida a un mecanismo de hipersensibilidad retardada. En cambio, no se observaron alteraciones histopatológicas en el cerebro de animales infectados con VXJCl3:

Las ratas endocriadas Buffalo/Sim respondieron en forma similar a las de la cepa Wistar a la infección con VJ.

Resultó de importancia determinar la sensibilidad de estos animales, para la realización de ensayos de transferencia de células, ya que la respuesta a una infección viral puede estar controlada genéticamente como sucede en ratones con el virus de la rabia (147) y con el MHV (104).

Es de gran valor el papel que juegan los macrófagos en la resistencia o susceptibilidad a numerosas infecciones virales cuando éstas se realizan por vía extraneural (95).

En el presente trabajo se estudió la influencia de estas células peritoneales en la infección experimental de la rata por vía ip.

En los primeros experimentos, se intentó determinar si la capacidad fagocitaria estaba alterada. Los resultados indicaron que la fagocitosis del S. aureus por los macrófagos peritoneales y por los elementos sanguíneos de animales lactantes o de adultos infectados, con una u otra cepa de VJ, no presentaba diferencias significativas con respecto a los controles sin infectar (Tabla 13).

Experiencias realizadas en cobayos infectados con VXJ demostraron que la fagocitosis tampoco estaba alterada (135), y datos similares se obtuvieron con macrófagos peritoneales de ratones inoculados con VXJ y VXJCl3 (168).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la infección de ratones con virus de Influenza, el cual no suprimió la fagocitosis mediada por macrófagos pulmonares hacia S. aureus, ni inhibió el efecto bactericida (169). Sin embargo, los macrófagos esplénicos y de la cavidad peritoneal de ratones infectados con virus Dengue, mostraron una reducción de la fagocitosis de rojo neutro y de partículas de látex (170). Además, la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales del ratón hacia glóbulos rojos de carnero recubiertos con IgM resultó inhibida por la infección con HSV (171).

En gran cantidad de infecciones virales, ha sido correlacionada la capacidad que puede tener una cepa viral para replicar en macrófagos, con la virulencia de esa cepa para el huésped; mientras que la capacidad de los macrófagos en restringir la multiplicación viral, fue relacionada con la resistencia a la infección (89) (172) (104).

Con el propósito de dilucidar se esta correlación se presentaba en el modelo rata-VJ, se realizaron con macrófagos peritoneales de ratas de 2 días infectadas por vía ip con ambas cepas de VJ ensayos de centros infecciosos.

Se observó que en los macrófagos de animales inoculados con VXJ, la replicación viral fue detectada desde el primer día pi, hasta llegar a ser alrededor de 10 veces superior a los 3 días pi.

La multiplicación viral en los macrófagos peritoneales de ratas que recibieron VXJCl3 fue menor, encontrando al tercer día pi alrededor de 30 veces menos centros infecciosos que en los animales infectados con la cepa patógena.

En adultos inoculados con una u otra cepa se detectaron mínimos centros infecciosos (Tabla 14).

De estos resultados surge que los macrófagos de ratas de 2 días actúan como células permisivas para la replicación del virus, no sucediendo lo mismo con las células de anima-

les adultos.

La capacidad de multiplicación es más elevada para VXJ, lo que implicaría una mayor liberación de virus infectivo, con la consiguiente invasión de tejidos vasculares y viremia, a través de la cual el virus accedería al SNC, como fue sugerido con los resultados obtenidos con la técnica de cocultivo para el aislamiento viral.

Estas experiencias llevan a conclusiones similares a las obtenidas con CMV (173) donde el bazo y el hígado resultan los principales órganos de replicación viral temprana. Los ratones esplenectomizados sobrevivieron en forma significativa a la infección y presentaron menores títulos de virus en hígado. Además, se determinó que los macrófagos esplénicos eran el sitio predominante para la multiplicación viral. Por lo tanto, la replicación temprana en macrófagos de bazo induciría la lesión hepática y contribuiría a la patogénesis de la infección.

Laguens y col (174) demostraron que VXJ replica en macrófagos y células dendríticas de cobayos, mientras que VXJCl3 sólo pudo asociarse a estas últimas. Además, en este modelo fueron observados altos títulos de virus en órganos ricos en macrófagos y por inmunofluorescencia se detectó una elevada infección de células fagocíticas de tejidos

hemopoiéticos, pulmones y glándulas adrenales, lo que sugiere que estas células cumplirían un papel importante (175).

Estudios realizados en ratón demostraron que el VJ multiplica en macrófagos peritoneales de animales lactantes y adultos, siendo mayor la sensibilidad de las células de ratones jóvenes, lo que coincide con la mayor sensibilidad de los mismos al virus (176).

También fueron obtenidos resultados similares con macrófagos peritoneales de ratones C3H infectados "in vitro" con MHV. Las células obtenidas a partir de animales de 4 semanas de edad, resistentes a la infección, produjeron 10 veces menos virus que los macrófagos de ratones de una semana de vida, los que son susceptibles a la infección (177).

Esto concuerda con lo observado en el modelo rata-VJ, ya que en los animales adultos se observó una mínima replicación viral.

Además, se comprobó que VXJ y VXJCl3 multiplican "in vitro" en macrófagos de ratón adulto. En este caso, los títulos con VXJCl3 fueron más altos aunque ambas cepas siguieron similares patrones de infección (168). Esto permite inferir que los macrófagos son los sitios primarios de la replicación del virus "in vivo".

Roberts (178) demostró que los macrófagos peritoneales

de ratones eran alrededor de 10 veces más susceptibles a la infección con una cepa virulenta de ectromelia, que con una atenuada.

Resultados análogos fueron obtenidos con LCM (103), con HSV-1 y HSV-2 (109) (102); aunque recientemente se vio que cepas de HSV-1 con alta o baja patogenicidad para ratones, replicaron en forma semejante en los macrófagos peritoneales (171), y con MHV (179) (104).

Además, estudios realizados con MHV-2 (180) mostraron que el virus es adsorbido en igual forma por macrófagos de ratones resistentes y sensibles, pero en las células de animales susceptibles, el virus multiplica alcanzando altos títulos, mientras que no lo hace en macrófagos de animales resistentes.

Contrariamente, el virus "Tick-borne encephalitis" es capaz de multiplicar tanto en macrófagos peritoneales de ratones altamente sensibles como de ratones resistentes, no existiendo en este caso, correlación entre multiplicación en macrófagos y resistencia "in vivo" (181).

También es interesante destacar que macrófagos de ratones resistentes y susceptibles a la infección con coronavirus, no presentaron replicación viral, tanto "in vitro" como "in vivo" (151) lo que indicaría que la resistencia en

este modelo no depende de la inhabilidad del virus de crecer en macrófagos.

En el modelo rata-VJ por vía ip, la detección de antígeno viral en macrófagos, por inmunofluorescencia, se correlacionó con los resultados obtenidos utilizando la técnica de centros infecciosos, ya que un mayor porcentaje de macrófagos peritoneales presentaron antígeno citoplasmático cuando los animales fueron infectados con VXJ que cuando fueron inoculados con VXJCl3 (Tabla 5).

Otra forma de estudiar el papel cumplido por los macrófagos en una infección viral, es mediante el bloqueo de los mismos. Esto puede ser realizado tratando los animales con suero antimacrófago, o con ciertos agentes químicos, como la Si, la cual es selectivamente tóxica para los macrófagos (139) (140).

En el presente trabajo, fue posible observar que las ratas de 11 días de vida, que resisten la infección con VXJ por vía ip, presentaron una mortalidad del 35% cuando fueron tratadas con Si (Figura 12a). Esto indicaría que la falta de sensibilidad en estos animales está dada por la capacidad de los macrófagos en prevenir la acción viral.

La resistencia a la infección con HSV (89), CMV (111), virus de la fiebre amarilla (90) y virus de la rabia (182),

fue también revertida por la Si o suero antimacrófago.

Por otra parte, cuando ratas de 2 días de edad infectadas con VXJ, fueron tratadas con Si, los animales resultaron protegidos en un 43,33%, lo que podría explicarse porque el bloqueo de las células macrofágicas no permite la multiplicación viral (Figura 12b).

Resultados similares, en los cuales la Si protege contra una infección, fueron obtenidos en ratones infectados con VJ (183) y con MHV-3 (184).

En conclusión, los ensayos realizados mediante tratamiento con Si, se correlacionan con los estudios de replicación viral, es decir, en los animales sensibles a la infección, el virus multiplica en los macrófagos y resultan protegidos al ser bloqueadas estas células. Por otra parte, en las ratas resistentes, el virus sería destruido por los macrófagos, y el tratamiento con Si alteraría la resistencia a la infección.

Estos resultados también concuerdan con experiencias realizadas con Calomys musculinus infectados por vía ip con VXJCl3 (185). Fue demostrado que los animales adultos, resistentes a la infección, presentaron una mortalidad del 27% luego de tratamiento con Si, rescatándose, además, virus de cerebro. Por otra parte, en lactantes sensibles a la infección, la mortalidad disminuyó y resultó retrasada cuando recibieron la droga.

La administración de Si a ratas de 2 días de vida infectadas con VXJCl3 (Figura 12c) no alteró la respuesta de los animales, lo que indicaría que la participación del macrófago en este modelo es poco relevante. En ratones lactantes y adultos y animales inmunosuprimidos, infectados con VXJ, el tratamiento con Si tampoco modificó el curso de la infección (186).

En general, las infecciones virales son más severas cuando se establecen durante el período neonatal que en la edad adulta. Para ello existen varias explicaciones: la madurez de las células que participan en la respuesta inmune; la mayor producción de interferón; cambios en receptores virales; temperatura corporal más estable, etc.

Los macrófagos pueden influir sobre las células que los rodean secretando productos bioactivos; presentando el antígeno a los linfocitos y siendo activados para eliminar gérmenes intracelulares. Los linfocitos deben interaccionar con el antígeno presentado por el macrófago para reconocerlo, y a su vez, el macrófago es regulado por las linfoquinas secretadas por los linfocitos (100).

Los linfocitos T pueden limitar una infección viral por destrucción de las células infectadas (187) o estimulando otras células, por ejemplo fagocitos mononucleares, las cuales

interfieren con la replicación viral (188).

La interacción entre el macrófago y la célula T requiere que el primero sintetice y exprese antígeno Ia en su membrana (189). Los macrófagos de los neonatos no expresan fenotípicamente el Ia, y más aún, los macrófagos inmaduros transferidos a adultos inhiben la expresión de este antígeno (108).

En el modelo rata-VXJ, los macrófagos jugarían un papel crítico en permitir la diseminación viral de la periferia al órgano blanco. Para estudiar la importancia que tiene la maduración de estas células en la sensibilidad dependiente de la edad de la rata infectada con VXJ, se realizaron transferencias de células peritoneales de animales adultos a lactantes, 24 hs antes de la inoculación de virus.

En un primer ensayo, se transfirieron células totales de exudado peritoneal, lográndose una disminución significativa de la mortalidad, la cual dependió de la concentración celular transferida (Figura 13).

La inoculación de células adherentes y no adherentes de ratas adultas por separado, no logró proteger a los animales de 2 días de vida de la infección ip con VXJ.

En infecciones con HSV (109) (110), CMV (111), Coxsackie (137), virus rábico (182) y MHV (177) (145), la transferencia de macrófagos de animales adultos resistentes a lactantes sus

ceptibles, ha permitido proteger a éstos últimos contra la infección.

Resulta interesante destacar que Levy-Leblond y Dupuy (144) demostraron que la transferencia de resistencia a ratones lactantes infectados con MHV-3, requirió linfocitos T junto con células adherentes de ratones adultos.

Esto resulta comparable a lo observado en el modelo rata-VXJ, ya que sólo la transferencia de células de exudado peritoneal de ratas maduras resultó efectiva en proteger a los lactantes, mientras que las células adherentes y no adherentes administradas separadamente, no tuvieron efecto. El "switch" de susceptibilidad a resistencia dependería de la maduración de otras poblaciones, además de los macrófagos, presentes en el exudado peritoneal, aparentemente linfocitos T.

La administración de células no adherentes de adultos no protegieron a los animales lactantes, ya que los macrófagos residentes en la cavidad peritoneal de los mismos no presentan antígeno Ia en su membrana celular, y por lo tanto, no pueden interaccionar con los linfocitos T de los donantes. Las células adherentes transferidas, tampoco interactuarían con los linfocitos T de los receptores, por no poseer éstos la madurez requerida.

Ha sido propuesto para infecciones virales (188) y bacterianas (190), que los fagocitos mononucleares, al ser activados por los linfocitos T, perderían la capacidad de permitir la replicación intracelular. Trabajos recientes de Lehmann-Grube y col. (191) postulan que en la infección por vía endovenosa con LCM del ratón adulto, los linfocitos T activados secretarían linfoquinas que interferirían directamente en células del entorno, incluyendo macrófagos.

Cuando ratas de 2 días de edad recibieron células peritoneales de animales del mismo grupo etario infectados con VXJ, les provocaron enfermedad y muerte en forma correlacionada con el número de células transferidas. Los resultados corroboran la hipótesis de que la replicación temprana del virus en macrófagos peritoneales sería la responsable de la diseminación viral hacia órganos y el acceso al SNC, dando lugar a la patogenia observada en las ratas de 2 días de edad inoculadas por vía ip con VXJ.

La administración temprana de inmunosuero homólogo anti VXJc13 permitió la sobrevivencia de las ratas de 2 días infectadas con VXJ.

Cuando el título del IS fue de 320 la mortalidad disminuyó al 45,45% vs. 75% de los controles sin tratamiento, pe

ro con un IS con título de 80, no se logró disminuir la mortalidad (Figura 14).

Estos datos indican la importancia de los Ac Nt en el modelo rata-VXJ y coinciden con lo registrado para los animales con diferentes grados de morbilidad, ya que cuanto mayores fueron los signos clínicos, menor fue el título de Ac Nt presentado.

La importancia de la transferencia temprana de IS ha sido demostrada para la rata (68) (67), así como para otros huéspedes experimentales inoculados con VJ (192) (193) y en numerosas infecciones por otros virus (90) (156) (158) (159).

Cuando los anticuerpos son dados luego de una inoculación periférica de un virus causante de encefalitis, la protección puede representar la neutralización del virus, antes de que éste alcance el órgano blanco (148), por inhibición del crecimiento viral en el sitio de inoculación (158) y en los tejidos de los animales (194).

Los ensayos de protección cruzada de ratas de 2 días de edad infectadas con VXJC13 por vía ip y desafiadas con VXJ por vía ic a distintos días pi, dieron como resultado la protección de los animales. Dicha protección fue posible a partir de los 10 días de edad, siendo obtenido el mayor grado de protección a los 12 días de vida (26,5% de mortalidad) (Fi

gura 15).

Los animales infectados con VXJCl3 y desafiados con VXJ no presentaron título de virus en cerebro (por UFP) en los tiempos estudiados, mientras que los controles inoculados con VXJ mostraron altos títulos desde los 5 días pi. Las ratas infectadas con VXJCl3 por vía ip presentaron títulos moderados de virus en cerebro (Tabla 16).

Los mecanismos responsables de la protección podrían ser: a) la neutralización de VXJ por los anticuerpos inducidos por la inoculación de VXJCl3, b) la activación de mecanismos celulares que eviten la hipersensibilidad retardada que causa el VXJ al ser inoculado ic en ratas de 12 días de vida (datos no publicados), c) la interferencia a la replicación de VXJ por presencia de VXJCl3 en cerebro de los animales protegidos, d) la acción del interferón endógeno, etc.

Estudios de protección realizados con VJ en cobayos, demostraron que la inoculación de las cepas atenuadas (25) (26) (28) y del virus Tacaribe (29) (30) confieren un 100% de protección contra un desafío con la cepa patógena. En el modelo primate, tanto VXJCl3 como el virus Tacaribe han protegido a los mismos frente a un desafío con VXJ (58) (59).

Trabajos realizados utilizando cepas de MHV, mostraron que los ratones inoculados por vía intranasal con una cepa de

baja virulencia (MHV-S), adquirieron resistencia contra la infección ip con la cepa virulenta (MHV-2) (195). Los títulos de virus en cerebro, bazo e hígado y la multiplicación viral en macrófagos fueron menores en los animales preinmunizados. Esto indica que la resistencia fue debida a la supresión del crecimiento de MHV-2 en órganos "target". Los Ac Nt no jugarían ningún rol, ya que no se detectó actividad neutralizante en ese estado temprano.

Además, estudios con HSV-1, demostraron que la cepa atenuada HSV-1 ANG, protege contra la infección fatal con HSV-1 WAL dada simultáneamente o 24 hs antes de la infección con la cepa patógena (196). La protección se debería a que HSV-1 ANG induce mucho más eficientemente la producción de interferón, así como de células NK.

6. CONCLUSIONES

- La rata de 2 días de vida inoculada por vía ip con VXJ presenta alrededor del 85% de mortalidad con evidentes signos neurológicos, decreciendo concomitantemente con la edad.

Los animales infectados con VXJC13 presentan una mortalidad de aproximadamente el 15% entre 1 y 3 días de edad, siendo luego resistentes a la infección viral.

Por lo tanto, la rata de 2 días de vida infectada con VJ por vía ip puede ser utilizada como marcador de virulencia para diferenciar cepas patógenas y atenuadas.

- La dosis más adecuada para mantener la diferencia de mortalidad entre ambas cepas es de 10^3 DL₅₀.

- El aislamiento viral en órganos, fue mayor en ratas infectadas con VXJ con respecto a las inoculadas con VXJC13 por cualquiera de los métodos empleados.

Utilizando la técnica de UFP sólo puede detectarse replicación viral en cerebro. Los títulos de virus fueron siempre más elevados en animales con mayor grado de enfermedad.

El rescate de virus por cocultivo demuestra que, en los animales infectados con VXJ, hay una replicación sostenida en hígado y bazo, seguida de viremia prolongada y persistente multiplicación viral en cerebro. Por el contrario, en ratas

infectadas con VXJCl3, la presencia viral es fugaz en hígado y bazo y la viremia breve.

La mayor neuropatogenicidad de VXJ estaría dada por una mayor capacidad de replicación de esta cepa viral en bazo e hígado, con una viremia prolongada que facilita el acceso del virus al SNC.

En ratas infectadas con VXJ, mediante ensayos de inmunofluorescencia, se evidenció antígeno viral en neuronas corticales y subcorticales, así como en astrocitos. Los animales inoculados con VXJCl3 presentaron una moderada expresión de antígeno en neuronas corticales.

- VXJ induce una mayor síntesis de Ac Nt, Ac Fc y Ac IF que VXJCl3.

Los animales inoculados con VXJ presentaron títulos más altos de Ac Nt cuanto menores son fueron los grados clínicos de enfermedad. Los Ac Fc y Ac IF no guardan relación con dichos grados.

Los animales infectados a diferentes edades con VXJ que sobreviven, presentan a los 35 días pi mayores títulos de Ac Nt, cuanto menor edad tienen al ser inoculados.

- No se detectó presencia de complejos antígeno- anticuerpo en bazo y en cerebro de ratas infectadas con VJ.

- La anatomía patológica demuestra en cerebro de ratas inoculadas con VXJ, la existencia de un infiltrado mononuclear meníngeo, lo que estaría indicando que la muerte de los animales se debería a una encefalitis la cual podría ser debida a un mecanismo de hipersensibilidad retardada. Por el contrario, no se observaron alteraciones histopatológicas en cerebro de animales infectados con VXJCl3.

- La fagocitosis del S. aureus por los macrófagos peritoneales y por los elementos sanguíneos de animales lactantes o a adultos infectados con una u otra cepa de VJ, no presenta diferencias significativas con respecto a los controles sin infectar.

- En células adherentes de animales inoculados con VXJ, la replicación viral (determinada por centros infecciosos) es mayor que en los infectados con VXJCl3. En adultos inoculados con una u otra cepa se detectaron mínimos centros infecciosos.

De acuerdo a estos resultados, se deduce que los macrófagos de ratas de 2 días actúan como células permisivas para la replicación del virus, no sucediendo lo mismo con las células de animales adultos.

La capacidad de multiplicación es más elevada para VXJ, lo que implicaría una mayor liberación de virus, con la con

siguiente invasión de tejidos vasculares y viremia, a través de la cual el virus accedería al SNC.

La detección de antígeno viral por inmunofluorescencia, corrobora los resultados obtenidos mediante la técnica de centros infecciosos, ya que un mayor porcentaje de macrófagos peritoneales presentaron antígeno citoplasmático en animales infectados con VXJ.

- Las ratas de 11 días de vida, que resisten la infección con VXJ por vía ip, presentan una mortalidad del 35% cuando son tratadas con Si. Cuando los animales de 2 días de edad son inoculados con Si, resultan protegidos en un 43%. Esto implicaría que las ratas sensibles a la infección resultan protegidas al ser bloqueados los macrófagos, ya que el virus no puede multiplicar en estas células. Por otra parte, en las ratas resistentes, el virus sería destruido por los macrófagos y el tratamiento con Si alteraría la resistencia a la infección.

La administración de Si a ratas de 2 días de vida infectadas con VXJCl3 no altera la respuesta de los animales, lo que indicaría que la participación del macrófago en este modelo es poco relevante.

- La transferencia de células de exudado peritoneal de animales adultos a lactantes infectados, dio como resultado una disminución significativa de la mortalidad, que depende de la

concentración celular transferida. La inoculación de células adherentes y no adherentes de ratas adultas por separado, no logró proteger a los animales de 2 días de la infección ip con VXJ. Por lo tanto, se requiere que las células adherentes y no adherentes (aparentemente linfocitos T) sean maduras, para interactuar entre ellas y limitar la infección.

- La transferencia a ratas de 2 días de edad de células peritoneales de animales del mismo grupo etario infectados con VXJ, les provocan enfermedad y muerte en forma correlacionada con el número de células transferidas. Los resultados corroboran la hipótesis de que la replicación temprana del virus en macrófagos peritoneales sería la responsable de la enfermedad en las ratas de 2 días de edad inoculadas ip con VXJ.

- La administración de IS permitió la sobrevivencia de ratas de 2 días infectadas con VXJ, lo que indica la importancia de los Ac Nt en el modelo rata-VXJ.

- La inoculación de VXJCl3 por vía ip a ratas de 2 días de edad, protegió a los animales frente a un desafío con VXJ por vía ic a partir de los 10 días de edad. En este grupo no se aisló virus en cerebro por UFP, mientras que los títulos fueron elevados en los controles infectados con VXJ.

Los mecanismos involucrados en la protección podrían ser: neutralización viral, inhibición de la hipersensibilidad retardada, interferencia, producción de interferón, etc.

J. R. Tezak

[Signature]

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Parodi, A.S.; Greenway, D.; Rugiero, H.; Frigerio, M.J.; de la Barrera, J.M.; Rivero, S.; Mettler, N.; Garzón, F.; Boxaca, M.; Guerrero, L.B. de; Nota, N.R. Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. *El Día Médico* 30: 2300, 1958.
- 2.- Pirotsky, I.; Zuccarini, J.; Barrera Oro, J.G.; Martini, P.; Copello, A. Virosis Hemorrágica del Noroeste Bonaerense. *Orient. Med.* 8: 171, 1959.
- 3.- Parodi, A.S.; Coto, C.E.; Boxaca, M.C.; Lajmanovich, S.; González, S.M. Characteristics of Junin virus, ethiological agent of Argentine Hemorrhagic Fever. *Arch. ges. Virusforsch.* 4: 393, 1966.
- 4.- Sabattini, M.S.; Maiztegui, J.I. Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (Bs. Aires)* 30, Supl.1: 111, 1970.
- 5.- Maiztegui, J.I.; Sabattini, M.S. Extensión progresiva del área endémica de Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (Bs. Aires)* 37, Supl.3: 162, 1977.
- 6.- Parodi, A.S.; de la Barrera, J.M.; Rugiero, H.R.; Greenway, D.J.; Mettler, N.; Martínez, A.; Boxaca, M.C. Los reservorios del virus de la Fiebre Hemorrágica Epidémica de la Provincia de Buenos Aires. *Prensa Med. Arg.* 46: 554, 1959.
- 7.- Sabattini, M.S.; González, L.E. Identificación directa de virus Junín en roedores silvestres infectados en la naturaleza. *Rev. Soc. Argent. Biol.* 43: 252, 1967.
- 8.- Kravetz, F. Ecología y control de reservorios. *Ciencia e Investigación* 33: 235, 1977.

- 9.- Rowe, W.P.; Murphy, F.A.; Bergold, G.H.; Casals, J.; Hotchin, J.; Johnson, K.M.; Lehmann-Grube, F.; Mims, C.A.; Traub, E.; Webb, P.A. Arenaviruses proposed name for a defined virus group. *J. Virol.* 5: 651, 1970.
- 10.- Pfau, C.J.; Bergold, G.H.; Casals, J.; Johnson, K.M.; Murphy, F.A.; Pedersen, I.R.; Rawls, W.E.; Rowe, W.P.; Webb, P.A.; Weissenbacher, M.C. Arenaviruses. *Intervirology* 4: 267, 1974.
- 11.- Murphy, F.A.; Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Whitfield, S.G. Morphological comparison of Machupo virus with lymphocytic choriomeningitis virus: Basis for a new taxonomic group. *J. Virol.* 4: 535, 1969.
- 12.- Murphy, F.A.; Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Whitfield, S.G.; Chappel, W.A. Arenoviruses in Vero cells: Ultrastructural studies. *J. Virol.* 6: 507, 1970.
- 13.- Lascano, E.F.; Berría, M.I. Microscopía electrónica de cultivos primarios de fibroblastos de ratón inoculados con virus Junín. *Medicina (Bs. Aires)* 29: 487, 1969.
- 14.- Lascano, E.F.; Berría, M.I. Microscopía electrónica del virus Junín en cultivos primarios de riñón de hamster y de riñón de conejo. *Medicina (Bs. Aires)* 31: 1, 1971.
- 15.- Martínez Segovia, Z.M. de; Grazioli, F. The nucleic acid of Junin virus. *Acta Virol.* 13: 264, 1969.
- 16.- Martínez Segovia, Z.M. de; De Mitri, M.I.; Grau, O.; Añón, M.C.; Franze Fernández, M.T. Estudios bioquímicos del virus Junín. *Medicina (Bs. Aires)* 37, Supl.3: 18, 1977.
- 17.- Martínez Segovia, Z.M. de; De Mitri, M.I. Junin virus structural proteins. *J. Virol.* 21: 579, 1977.

- 18.- Grau, O.; Franze Fernández, M.T.; Romanowski, V.; Rustici, S.M.; Rosas, M.F. Junin virus structure. In The replication of negative strand viruses. (Bishop, D.H.L.; Compans, R.W., ed.) Elsevier North Holland, N. York, pag. 11, 1981.
- 19.- De Mitri, M.I.; Martínez Segovia, Z.M. de. Biological activities of Junin virus proteins. II. Complement-fixing polypeptides associated with the soluble antigen and purified particles. *Intervirology* 14: 84, 1980.
- 20.- De Mitri, M.I.; Martínez Segovia, Z.M. de. Proteínas del virus Junín asociadas a la célula infectada. Resumen III Cong. Arg. de Microbiol., G-170, 1982.
- 21.- Boxaca, M.C.; Parodi, A.S.; Rugiero, H.; Blay, R. Fiebre Hemorrágica experimental en el cobayo (virus Junín). *Rev. Soc. Argent. Biol.* 37: 170, 1961.
- 22.- Guerrero, L.B. de; Boxaca, M.C.; Weissenbacher, M.C.; Frigerio, M. J. Infección experimental del cobayo con virus Junín. II. Cuadro clínico, diseminación y eliminación del virus. *Medicina (Bs. Aires)* 37: 271, 1977.
- 23.- González, S.M.; Mejszenkier, J.D. Variaciones hematológicas en los cobayos con Fiebre Hemorrágica Experimental (virus Junín). *Rev. Soc. Argent. Biol.* 38: 392, 1962.
- 24.- Nota, N.R.; Frigerio, M.J.; Guerrero, L.B. de; Nejamkis, M.R. Estudio hematológico en cobayos infectados con virus Junín, cepa XJ y cepa XJCl3. *Medicina (Bs. Aires)* 29: 171, 1969.

- 25.- Guerrero, L.B. de; Weissenbacher, M.C.; Parodi, A.S. Inmunización contra la FHA con una cepa atenuada del virus Junín. I. Estudio de una cepa modificada del virus Junín. Inmunización de cobayos. Medicina (Bs. Aires) 29: 1, 1969.
- 26.- Avila, M.M.; Samoilovich, S.R.; Weissenbacher, M.C. Infección del cobayo con la cepa atenuada del virus Junín XJC13. Medicina (Bs. Aires) 39: 597, 1979.
- 27.- Guerrero, L.B. de; Boxaca, M.C. Estudio preliminar de una variante atenuada del virus Junín derivada de la cepa prototipo XJ. Medicina (Bs. Aires) 40: 267, 1980.
- 28.- Boxaca, M.C.; Guerrero, L.B. de; Frigerio, M.J.; Rordinone, S.N.; Rabinovich, R.D. Algunos aspectos de la infección experimental del cobayo con una variante atenuada del virus Junín. Medicina (Bs. Aires) 40: 521, 1980.
- 29.- Coto, C.E.; Rey, E.; Parodi, A.S. Tacaribe virus infection of guinea pig. Virus distribution, appearance of antibodies, and immunity against Junin virus infection. Arch. ges. Virusforsch. 20: 81, 1967.
- 30.- Coto, C.E.; Damonte, E.B.; Calello, M.A.; Weissenbacher, M.C. Protection of guinea pigs inoculated with Tacaribe virus against lethal doses of Junin virus. J. Infect. Dis. 141: 389, 1980.
- 31.- Parodi, A.S.; Nota, N.R.; Guerrero, L.B. de; Frigerio, M.J.; Weissenbacher, M.C.; Rey, E. Inhibition of immune response in experimental hemorrhagic fever (Junin virus). Acta Virol. 11: 120, 1967.
- 32.- Parodi, A.S.; Frigerio, M.J.; Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.; Guerrero, L. B. de; Bisso, G.M. Inhibición de la respuesta inmunológica secundaria en la fiebre hemorrágica experimental (virus Junín). Medicina (Bs. Aires) 30: 137, 1970.

- 33.- Frigerio, M.J. Aspectos inmunológicos del cobayo infectado con virus Junín. Medicina (Bs. Aires) 37, Supl.3: 96, 1977.
- 34.- Nota, N.R.; Frigerio, M.J.; Guerrero, L.B. de; Nejamkis, M.R. Depression of Jones Mote hypersensitivity by Junin virus. Arch. ges. Virusforsch. 30: 303, 1970.
- 35.- Nota, N.R.; Frigerio, M.J.; Besuchio, S.; Nejamkis, M.R.; Bisso, G.M. Estudios inmunológicos en FHA experimental. II.Fenómeno de Arthus. Medicina (Bs. Aires) 31: 170, 1971.
- 36.- Carballal, G.; Oubiña, J.R.; Rondinone, S.N.; Elsner, B.; Frigerio, M.J. Cell-mediated immunity and lymphocyte populations in experimental Argentine Hemorrhagic Fever (Junin virus). Infect. Immun. 34: 323, 1981.
- 37.- Frigerio, M.J.; Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.; Bisso, G.M.; Guerrero, L. B. de. Estudios inmunológicos en fiebre hemorrágica experimental. I. Intervención de una cepa atenuada de virus Junín en la respuesta inmunológica. Medicina (Bs. Aires) 31: 161, 1971.
- 38.- Blejer, J.L.; Galassi, N.V.; Nejamkis, M.R.; Barrios, H.A.; Nota, N.R. Marcadores inmunológicos de atenuación en cobayos infectados con cepas o variantes del virus Junín. Medicina (Bs. Aires) 41: 44, 1981.
- 39.- Galassi, N.V.; Blejer, J.L.; Barrios, H.A.; Nejamkis, M.R.; Nota, N.R. New attenuation marker for Junin virus based on immunologic responses of guinea pigs. J. Infect. Dis. 145: 331, 1982.
- 40.- Blejer, J.L.; Galassi, N.V.; Nejamkis, M.R.; Weissenbacher, M.C.; Nota, N.R. Infección experimental del cobayo con virus Tacaribe: acción sobre la función del aparato inmunocompetente. Rev. Asoc. Argent. Microbiol. 13: 59, 1981.

- 41.- Boxaca, M.C.; Giovanniello, O.A.; Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.; Guerrero, L.B. de; Frigerio, M.J. Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junín: Cuadro clínico y susceptibilidad. Rev. Asoc. Argent. Microbiol. 5: 1, 1973.
- 42.- Giovanniello, O.A.; Boxaca, M.C.; Nota, N.R.; Nejamkis, M.R. Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junín: Enfermedad tipo. Rev. Asoc. Argent. Microbiol. 7: 8, 1975.
- 43.- Schmuñis, G.A.; Weissenbacher, M.C.; Parodi, A.S. Tolerance to Junin virus in thymectomized mice. Arch. ges. Virusforsch. 21: 200, 1967.
- 44.- Weissenbacher, M.C.; Schmuñis, G.A.; Parodi, A.S. Junin virus multiplication in thymectomized mice. Effect of thymus and immunocompetent cells grafting. Arch. ges. Virusforsch. 26: 63, 1969.
- 45.- Weissenbacher, M.C.; Laguens, R.P.; Quintans, C.J.; Calello, M.A.; Montoro, L.; Woyskowsky, N.M.; Zannoli, V.H. Persistencia viral y ausencia de lesiones en el encéfalo de ratones congénicamente atímicos infectados con virus Junín. Medicina (Bs. Aires) 43: 403, 1983.
- 46.- Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.; Frigerio, M.J.; Guerrero, L.B. de. Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junín. Efecto del suero antitimocito. Medicina (Bs. Aires) 33: 398, 1973.
- 47.- Taratuto, A.L.; Tkaczewski, L.Z.; Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.; Giovanniello, O.A. Junin virus encephalitis in mice: its inhibition by antithymocyte serum. Arch. ges. Virusforsch. 43: 173, 1973.
- 48.- Giovanniello, O.A.; Boxaca, M.C. Effect of cyclophosphamide on Junin virus infection of mice. Medicina (Bs. Aires) 33: 368, 1973.
- 49.- Coto, C.E. León, M. Susceptibilidad exacerbada del ratón de 10 días a la infección con arenavirus. Medicina (Bs. Aires) 38: 281, 1978.

- 50.- Boxaca, M.C.; Guerrero, L.B. de; Savy, V.L. The occurrence of virus interferon and circulating antibodies in mice after experimental infection with Junin virus. Arch. ges. Virusforsch. 40: 10, 1973.
- 51.- Weissenbacher, M.C.; Calello, M.A.; Colillas, O.J.; Golfera, H.; Rondinone, S.N.; Frigerio, M.J. Infección de primates del nuevo mundo con virus Junín. I. Alouatta carayá. Medicina (Bs. Aires) 38: 529, 1978.
- 52.- Weissenbacher, M.C.; Callelo, M.A.; Colillas, O.J.; Golfera, H.; Frigerio, M.J. Infección con virus Junín del Alouatta carayá (mono aullador). Rev. Asoc. Argent. Microbiol. 10: 43, 1978.
- 53.- Frigerio, M.J.; Rondinone, S.N.; Laguens, R.P.; Calello, M.A.; Cabeza Meckert, P.; Colillas, O.; Weissenbacher, M.C. Infección de primates del nuevo mundo con virus Junín. III. Saimiri sciureus. Medicina (Bs. Aires) 42: 519, 1982.
- 54.- Samoilovich, S.R.; Rondinone, S.N.; Laguens, R.P.; Colillas, O.; Frigerio, M.J.; Weissenbacher, M.C. Infección de primates del nuevo mundo con virus Junín. IV. Aotus trivirgatus. Rev. Asoc. Argent. Microbiol. 15: 219, 1983.
- 55.- Carballal, G.; Cossio, P.; Arana, R.; Nagle, C.; Casanova, M. El Cebus sp como modelo experimental para la Fiebre Hemorrágica Argentina. Medicina (Bs. Aires) 40: 734, 1980.
- 56.- Weissenbacher, M.C.; Calello, M.A.; Colillas, O.J.; Rondinone, S.N.; Frigerio, M.J. Argentine Hemorrhagic Fever: A primate model. Intervirology 11: 363, 1979.
- 57.- Weissenbacher, M.C.; Calello, M.A.; Rondinone, S.N.; Travi, B.; Frigerio, M.J. Infección de primates del nuevo mundo con virus Junín. II. Callithrix jacchus. Medicina (Bs Aires) 40: 21, 1980.

- 58.- Avila, M.M.; Frigerio, M.J.; Weber, E.L.; Rondinone, S.N.; Samoilovich, S.R.; Laguens, R.P.; Guerrero, L.B. de; Weissenbacher, M.C. Attenuated Junin virus infection in Callithrix jacchus. J. Med. Virol. 15: 93, 1985.
- 59.- Weissenbacher, M.C.; Coto, C.E.; Calello, M.A.; Rondinone, S.N.; Damonte, E.B.; Frigerio, M.J. Cross-protection in nonhuman primates against Argentine Hemorrhagic Fever. Infect. Immun. 35: 425, 1982.
- 60.- Nejamkis, M.R.; Weissenbacher, M.C.; Calello, M.A. Infección experimental con virus Junín en la rata. Medicina (Bs. Aires) 37, Supl.3: 121, 1977.
- 61.- Laguens, R.P.; Cabeza Meckert, P.; Avila, M.M.; Nejamkis, M.R.; Weissenbacher, M.C. Infección crónica con virus Junín en la rata. Estudios patológicos y virológicos. Medicina (Bs. Aires) 43: 391, 1983.
- 62.- Avila, M.M.; Galassi, N.V.; Weissenbacher, M.C. Argentine Hemorrhagic Fever: A biologic marker. Intervirology 15: 97, 1981.
- 63.- Nejamkis, M.R.; Laguens, R.P.; Avila, M.M.; Galassi, N.V.; Cabeza Meckert, P.; Weissenbacher, M.C. Infección experimental de la rata con virus Junín: Estudios virológicos, morfológicos e inmunológicos. Premio Parodi, 1980.
- 64.- Galassi, N.V.; Blejer, J.L.; Barrios, H.A.; Nejamkis, M.R. Acción de la ciclofosfamida en la infección experimental de la rata con dos cepas de virus Junín. Rev. Asoc. Argent. Microbiol. 13: 69, 1981.
- 65.- Iascano, E.F.; Blejer, J.L.; Galassi, N.V.; Nejamkis, M.R. Immunocytochemical evaluation of brain inflammatory reaction in Junin virus-infected rats. Com. Biol. 3: 209, 1984.
- 66.- Blejer, J.L.; Galassi, N.V.; Nejamkis, M.R. Action of antithymocyte serum on Junin virus infection in rats. Acta Virol. 27: 484, 1983.

- 67.- Blejer, J.L.; Galassi, N.V.; Muñiz Saavedra, V.; Nejamkis, M.R.
Protection conferred against Junin virus infection in rats.
Intervirology 21: 174, 1984.
- 68.- Avila, M.M.; Sangiorgio, P.; Weissenbacher, M.C.; Efecto del tratamiento con inmunosuero en ratas infectadas con virus Junín. *Medicina (Bs. Aires)* 42: 333, 1982.
- 69.- Merigan, T.C. Host defenses against viral disease. *N. Engl. J. Med.* 290: 323, 1974.
- 70.- Zawatzky, R.; Hilfenhaus, J.; Marcucci, F.; Kircinner, H. Experimental infection of inbred mice with Herpes Simplex virus. I. Investigation of humoral and cellular immunity and of interferon induction. *J. gen. Virol.* 53: 31, 1981.
- 71.- Kirchner, H.; Engler, H.; Schröder, C.H.; Zawatzky, R.; Storch, E. Herpes Simplex virus type 1-induced interferon production in peritoneal exudate cells of the mouse. *J. gen. Virol.* 64: 437, 1983.
- 72.- Mims, C.A. Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bacteriol. Rev.* 28: 30, 1964.
- 73.- Welsh, R.M. Host cell modification of lymphocytic choriomeningitis virus and Newcastle disease virus altering viral inactivation by human complement. *J. Immunol.* 118: 348, 1977.
- 74.- Cowan, K.M. Antibody response to viral antigens. *Adv. Immunol.* 17: 195, 1973.
- 75.- Daniels, C.A. Mechanism of virus neutralization. In *Viral Immunology and Immunopathology*. (A.L. Notkins, ed). Academic Press, New York, pag. 79, 1975.

- 76.- Oldstone, M.B.A.; Cooper, N.R.; Larson, D.L. Formation and biologic role of polyoma virus-antibody complexes. *J. Exp. Med.* 140: 549, 1974.
- 77.- Gollins, S.W.; Porterfield, J.S. Flavivirus infection enhancement in macrophages: Radioactive and biological studies on the effect of antibody on viral fate. *J. gen. Virol.* 65: 1261, 1984.
- 78.- Keller, R. Studies on the mechanism of the enzymatic reactivation of antibody-neutralized poliovirus. *J. Immunol.* 100: 1071, 1968.
- 79.- Yoshino, K.; Taniguchi, S. Effect of complement upon viral neutralization. *J. Immunol.* 102: 1341, 1969.
- 80.- Welsh, R.M.; Lampert, P.W.; Burner, P.A.; Oldstone, M.B.A. Antibody-complement interaction with purified lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 73: 59, 1976.
- 81.- Haukenes, G. Demonstration of host antigens in the myxovirus membrane: Lysis of virus by antibody and complement. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.* 85: 125, 1977.
- 82.- Halstead, S.B. In vivo enhancement of Dengue virus infection in Rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J. Infect. Dis.* 140: 527, 1979.
- 83.- Oldstone, M.B.A.; Dixon, F.J. Immune complex disease associated with viral infections. In *Viral Immunology and Immunopathology*. (A.L. Notkins, ed). Academic Press, New York, pag. 341, 1975.
- 84.- Bloom, B.R.; Rager-Zisman, B. Cell-mediated immunity in viral infections. In *Viral Immunology and Immunopathology*. (A.L. Notkins, ed) Academic Press, New York, pag. 113, 1975.
- 85.- Yap, K.L.; Braciale, T.J.; Ada, G.L. Role of T-cell function in recovery from murine influenza infection. *Cell. Immunol.* 43: 341, 1979.

- 86.- Blanden, R.V.; Gardner, I.D. The cell-mediated immune response to Ectromelia virus infection. I. Kinetics and characteristics of the primary effector T cell response in vivo. *Cell. Immunol.* 22: 271, 1976.
- 87.- Byrne, J.A.; Oldstone, M.B.A. Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *J. Virol.* 51: 682, 1984.
- 88.- Blanden, R.V. Mechanisms of recovery from a generalized viral infection: Mousepox. I. The effects of anti-thymocyte serum. *J. Exp. Med.* 132: 1037, 1970.
- 89.- Zisman, B.; Hirsch, M.S.; Allison, A.C. Selective effects of anti-macrophage serum, silica and anti-lymphocyte serum on pathogenesis of Herpes Simplex virus infection in young adult mice. *J. Immunol.* 104: 1155, 1970.
- 90.- Zisman, B.; Wheelock, E.F.; Allison, A.C. Role of macrophages and antibody in resistance of mice against yellow fever virus. *J. Immunol.* 107: 236, 1971.
- 91.- Nahmias, R.J.; Hirsch, M.S.; Kramer, J.H.; Murphy, F.A. Effect of antilymphocyte serum on herpesvirus hominis (type 1) infection in adult mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132: 696, 1969.
- 92.- Blanden, R.V.; Doherty, P.C.; Dunlop, M.B.C.; Gardner, I.D.; Zinkernagel, R.M.; David, C.S. Genes required for T cell mediated cytotoxicity against virus infected target cells are in the K or D regions of the H-2 gene complex. *Nature (London)* 254: 269, 1975.
- 93.- Borden, E.C.; Nathanson, N. Tacaribe virus infection of the mouse: An immunopathologic disease model. *Lab. Invest.* 4: 465, 1974.

- 94.- Monjan, A.A.; Cole, G.A.; Nathanson, N. Pathogenesis of cerebellar hypoplasia produced by lymphocytic choriomeningitis virus infection of neonatal rats: protective effect of immunosuppression with anti-lymphoid serum. *Infect. Immun.* 10: 499, 1974.
- 95.- Mogensen, S.C. Role of macrophages in natural resistance to virus infections. *Microbiol. Rev.* 43: 1, 1979.
- 96.- Metchnikoff, E. *Leçons sur le pathologie comparée de l' inflammation.* Masson, Paris, 1892.
- 97.- van Furth, R.; Cohn, Z.A.; Hirsch, J.G.; Humphrey, J.H.; Spector, W. G.; Langevoort, H.L. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. *Bull. W.H.O.* 46: 845, 1972.
- 98.- Berken, A.; Benacerraf, B. Properties of antibodies cytophilic for macrophages. *J. Exp. Med.* 123: 119, 1966.
- 99.- Lay, W.H.; Nussenzweig, V. Receptors for complement on leukocytes. *J. Exp. Med.* 128: 991, 1968.
- 100.- Unanue, E.R. Regulatory functions of mononuclear phagocytes. In *Progress in Immunology V.* (Y. Yamamura and T. Tada, ed) Academic Press, Tokyo, pag 973, 1984.
- 101.- Friedlander, A.M.; Jahrling, P.B.; Merrill, P.; Tobery, S. Inhibition of mouse peritoneal macrophage DNA synthesis by infection with the arenavirus Pichinde. *Infect. Immun.* 43: 283, 1984.
- 102.- Mogensen, S.C. Role of macrophages in hepatitis induced by Herpes Simplex virus types 1 and 2 in mice. *Infect. Immun.* 15: 686, 1977.

- 103.- Tosolini, F.A.; Mims, C.A. Effect of murine strain and viral strain on the pathogenesis of lymphocytic choriomeningitis infection and a study of footpad responses. *J. Infect. Dis.* 123: 134, 1971.
- 104.- Taguchi, F.; Yamaguchi, R.; Makino, S.; Fujiwara, K. Correlation between growth potential of Mouse Hepatitis viruses in macrophages and their virulence for mice. *Infect. Immun.* 34: 1059, 1981.
- 105.- Olitsky, P.K.; Sabin, A.B.; Cox, H.R. An acquired resistance of growing animals to certain neurotropic viruses in the absence of humoral antibodies or previous exposure to infection. *J. Exp. Med.* 64: 723, 1936.
- 106.- Argyris, B.F. Effect of injection of adult mouse peritoneal macrophages on suppressor cell activity in neonatal mice. *Cell. Immunol.* 74: 313, 1982.
- 107.- Knoblich, A.; Görtz, J.; Härle-Grupp, V.; Falke, D. Kinetics and genetics of Herpes Simplex virus-induced antibody formation in mice. *Infect. Immun.* 39: 15, 1983.
- 108.- Snyder, D.S.; Lu, C.Y.; Unanue, E.R. Control of macrophage Ia expression in neonatal mice. Role of a splenic suppressor cell. *J. Immunol.* 128: 1458, 1982.
- 109.- Hirsch, M.S.; Zisman, B.; Allison, A.C. Macrophages and age-dependent resistance to Herpes Simplex virus in mice. *J. Immunol.* 104: 1160, 1970.
- 110.- Mogensen, S.C. Macrophages and age-dependent resistance to hepatitis induced by Herpes Simplex virus type 2 in mice. *Infect. Immun.* 19: 46, 1978.
- 111.- Selgrade, M.K.; Osborn, J.E. Role of macrophages in resistance to murine cytomegalovirus. *Infect. Immun.* 10: 1383, 1974.

- 112.- Lopez, C.; Dudas, G. Replication of Herpes virus type 1 in macrophages from resistant and susceptible mice. *Infect. Immun.* 23: 432, 1979.
- 113.- Johnson, R.T. Pathogenesis of CNS infections. In *Viral infections of the nervous system*. Raven Press, New York, pag 37, 1982.
- 114.- Johnson, R.T. The pathogenesis of Herpes virus encephalitis. I. Virus pathways to the nervous system of suckling mice demonstrated by fluorescent antibody staining. *J. Exp. Med.* 119: 343, 1964.
- 115.- Nir, J.; Beemer, A.; Goldwasser, R.A. West Nile virus infection in mice following exposure to a viral aerosol. *Br. J. Exp. Pathol.* 46: 443, 1965.
- 116.- Fischman, H.R.; Schaeffer, M. Pathogenesis of experimental rabies as revealed by immunofluorescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 177: 78, 1971.
- 117.- Bodian, D. Viremia in experimental poliomyelitis. I. General aspects of infection after intravascular inoculation with strains of high and low invasiveness. *Am. J. Hyg.* 60: 339, 1954.
- 118.- Johnson, R.T.; Mims, C.A. Pathogenesis of viral infections of the nervous system. *N. Eng. J. Med.* 278: 23, 1968.
- 119.- Gresser, I.; Lang, D.J. Relationships between viruses and leukocytes. *Prog. Med. Virol.* 8: 62, 1966.
- 120.- Blinzinger, K.; Simon, J.; Magrath, D.; Boulger, L. Poliovirus crystals within the endoplasmic reticulum of endothelial and mononuclear cells in the monkey spinal cord. *Science* 163: 1336, 1969.

- 121.- Swarz, J.R.; Brooks, B.R.; Johnson, R.T. Spongiform poliоencephalomyelopathy caused by a murine retrovirus. II. Ultrastructural localization of virus replication and spongiform changes in the central nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 7: 365, 1981.
- 122.- Albrecht, P. Pathogenesis of neurotropic arbovirus infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 43: 44, 1968.
- 123.- Murphy, F.A.; Whitfield, S.G. Eastern equine encephalitis virus infection: Electron microscopic studies of mouse central nervous system. *Exp. Mol. Pathol.* 13: 131, 1970.
- 124.- Summers, B.A.; Griesen, H.A.; Appel, M.J.G. Possible initiation of viral encephalomyelitis in dogs by migrating lymphocytes infected with distemper. *Lancet* 1: 187, 1978.
- 125.- Lipton, H.L.; Johnson, R.T. The pathogenesis of rat virus infections in the newborn hamster. *Lab. Invest.* 27: 508, 1972.
- 126.- Herndon, R.M.; Johnson, R.T.; Davis, L.E.; Descalzi, L.R. Ependymitis in mumps virus meningitis. Electron microscopical studies of cerebrospinal fluid. *Arch. Neurol.* 30: 475, 1974.
- 127.- Wolinsky, J.S.; Berg, B.O.; Maitland, C.J. Progressive rubella panencephalitis. *Arch. Neurol.* 33: 722, 1976.
- 128.- Reed, L.J.; Muench, H.A. A simple method of estimating fifty percent of points. *Am. J. Hyg.* 27: 493, 1938.
- 129.- Rhim, J.S.; Simizu, B.; Wiebenga, N.H. Growth of Junin virus, the etiological agent of Argentinian Hemorrhagic Fever in cell cultures. *Arch. ges. Virusforsch.* 21: 243, 1967.
- 130.- Giovanniello, O.A.; Weber, E.L.; Rabinovich, R.D. Un nuevo ensayo de placas para la cuantificación del virus Junín. *Rev. Asoc. Argent. Microbiol.* 13: 17, 1981.

- 131.- Horta-Barbosa, L.; Fuccillo, D.A.; Sever, J.L.; Zeman, W. Subacute Sclerosing Panencephalitis: Isolation of measles virus from a brain biopsy. *Nature (London)* 221: 974, 1969.
- 132.- Casals, J. Serological reactions with arenaviruses. *Medicina (Bs. Aires)* 37, Supl. 3: 59, 1977.
- 133.- Carballal, G.; Cossio, P.; Rabinovich, A.; Oubiña, J.; Arana, R.M. Description of a BHK/21 cell line persistently infected with Junin virus: Its use in diagnostic procedures. *Intervirology* 14: 173, 1980.
- 134.- Golstein, P.; Blomgren, H. Further evidence for autonomy of T cells mediating specific in vitro cytotoxicity: Efficiency of very small amounts of highly purified T cells. *Cell. Immunol.* 9: 127, 1973.
- 135.- Nejamkis, M.R.; Nota, N.R.; Bisso, G.M.; Carballal, G.; Frigerio, M. J. Estudios inmunológicos en la fiebre hemorrágica experimental. II. Comportamiento de las células fagocitarias en animales infectados con la cepa prototipo XJ. *Medicina (Bs. Aires)* 31: 161, 1971.
- 136.- *Manual of Clinical Microbiology.* (E.H.Lennette, E.H. Spaulding, J. P. Truant, ed). American Society for Microbiology, pag. 933, 1974.
- 137.- Rager-Zisman, B.; Allison, A.C. The role of antibody and host cells in the resistance of mice against infection by Coxackie B-3 virus. *J. Gen. Virol.* 19: 329, 1973.
- 138.- Carballal, G.; Cossio, P.M.; Laguens, R.P.; Ponzinibbio, L.; Oubiña, J.R.; Cabeza Meckert, P.; Rabinovich, A.; Arana, R.M. Junin virus infection of guinea pigs. Immunohistochemical and ultrastructural studies of hemopoietic tissue. *J. Infect. Dis.* 143: 7, 1981.
- 139.- Allison, A.C.; Harington, J.S.; Birbeck, M. An examination of the cytotoxic effect of silica on macrophages. *J. Exp. Med.* 124: 141, 1966.

- 140.- O'Rourke, E.J.; Halstead, S.B.; Allison, A.C.; Plates-Mills, T.A.E. Specific lethality of silica for human peripheral blood mononuclear phagocytes, in vitro. *J. Immunol. Methods* 19: 137, 1978.
- 141.- Sigel, M.M. Influence of age on susceptibility to virus infections with particular reference to laboratory animals. *Annu. Rev. Microbiol.* 6: 247, 1952.
- 142.- Eldadah, A.H.; Nathanson, N.; Sarsitis, R. Pathogenesis of West Nile virus encephalitis in mice and rats. I. Influence of age and species on mortality and infection. *Amer. J. Epid.* 86: 765, 1967.
- 143.- Reinartz, A.B.G.; Broome, M.G.; Sagik, B.P. Age-dependent resistance of mice to Sindbis virus infection: viral replication as a function of host age. *Infect. Immun.* 3: 268, 1971.
- 144.- Levy-Leblond, E.; Dupuy, J.M. Neonatal susceptibility to MHV-3 infection in mice. I. Transfer of resistance. *J. Immunol.* 118: 1219, 1977.
- 145.- Stohlman, S.A.; Frelinger, J.A.; Weiner, L.P. Resistance to fatal central nervous system disease by mouse hepatitis virus strain JHM. *J. Immunol.* 124: 1733, 1980.
- 146.- Pickel, K.; Müller, M.A.; Termeulen, V. Analysis of age-dependent resistance to murine coronavirus JHM infection in mice. *Infect. Immun.* 34: 648, 1981.
- 147.- Lodmell, D.L. Genetic control of resistance to street rabies virus in mice. *J. Exp. Med.* 157: 451, 1983.
- 148.- Camenga, D.L.; Nathanson, N.; Cole, G.A. Cyclophosphamide-potentiated West Nile viral encephalitis: Relative influence of cellular and humoral factors. *J. Infect. Dis.* 130: 634, 1974.

- 149.- Sorensen, O.; Percy, D.; Dales, S. In vivo and in vitro models of demyelinating diseases. III. JMH virus infection of rats. Arch. Neurol. 37: 478, 1980.
- 150.- Brooks, B.R.; Swarz, J.R.; Johnson, R.T. Spongiform poliоencephalomyelopathy caused by a murine retrovirus. Lab. Invest. 43: 480, 1980.
- 151.- Pearson, J.; Mims, C.A. Selective vulnerability of neural cells and age-related susceptibility to OC43 virus in mice. Arch. Virol. 77: 109, 1982.
- 152.- Jennings, R.; Potter, C.W.; Teh, C.Z.; Mahmud, M.L.A. The replication of type A Influenza viruses in the infant rat: a marker for virus attenuation. J. gen. Virol. 49: 343, 1980.
- 153.- Carrigan, D.R.; Mc Kendall, R.R.; Johnson, K.P. CNS disease following dissemination of SSPE Measles virus from intraperitoneal inoculation of suckling hansters. J. Med. Virol. 2: 347, 1978.
- 154.- Yamamoto, T.; Otani, S.; Shiraki, H. A study of the evolution of viral infection in experimental Herpes Simplex encephalitis and rabies by means of fluorescent antibody. Acta Neuropathol. 5: 288, 1965.
- 155.- Luyet, F.; Samra, D.; Soneji, A.; Marks, M.I. Passive immunization in experimental Herpesvirus hominis infection of newborn mice. Infect. Immun. 12: 1258, 1975.
- 156.- Mc Kendall, R.R.; Klassen, T.; Baringer, J.R. Host defenses in Herpes Simplex infections of the nervous system: Effect of antibody on disease and viral spread. Infect. Immun. 23: 305, 1979.

- 157.- Worthington, M.; Conliffe, M.A.; Baron, S. Mechanism of recovery from systemic Herpes Simplex virus infection. II. Effectiveness of antibody reconstitution of nude and neonatally thymectomized mice (41005). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 165: 462, 1980.
- 158.- Kino, Y.; Hayashi, Y.; Hayashida, I.; Mori, R. Dissemination of Herpes Simplex virus in nude mice after intracutaneous inoculation and effect of antibody on the course of infection. J. gen. Virol. 63: 475, 1982.
- 159.- Mokhtarian, F.; Shah, K.V. Pathogenesis of K Papovavirus infection in athymic nude mice. Infect. Immun. 41: 434, 1983.
- 160.- Rabinowitz, S.G.; Adler, W.H. Host defenses during primary Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection in mice. I. Passive transfer of protection with immune serum and immune cells. J. Immunol. 110: 1345, 1973.
- 161.- Remesar, M.C.; Lerman, G.L.; Nejamkis, M.R. Efecto de la infección de virus Junín sobre el sistema linforreticular de la rata. Resumen IV Cong. Arg. de Microbiol., B-49, 1985.
- 162.- Salaman, M.H. Immunodepression by viruses. Antibiotica et chemotherapia 15: 393, 1969.
- 163.- Woodruff, J.F.; Woodruff, J.J. The effect of viral infections on the function of the immune system. In Viral Immunology and Immunopathology (A.L. Notkins, ed). Academic Press, New York, pag 393, 1975.
- 164.- Bro-Jørgensen, K.; Volkert, M. Defects in the immune system of mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Infect. Immun. 9: 605, 1974.

- 165.- Mims, C.A. Factors in the mechanism of persistence of viral infections. *Prog. Med. Virol.* 18: 1, 1974.
- 166.- Notkins, A.L. Effect of virus infection on immune function. In Miescher 6th Int. Symp. Immunopathol. Springer, Berlin, pag. 413, 1970.
- 167.- Brenda, R.; Itronovsky, V.; Cerva, L. Demonstration of lymphocytic choriomeningitis virus in cell cultures and mouse brain by the fluorescent antibody technique. *Acta Virol.* 9: 347, 1965.
- 168.- González, P.H.; Lampuri, J.S.; Coto, C.E.; Laguens, R.P. In vitro infection of murine macrophages with Junin virus. *Infect, Immun.* 35: 356, 1982.
- 169.- Nugent, K.M.; Pesanti, E.L. Effect of influenza infection on the phagocytic and bactericidal activities of pulmonary macrophages. *Infect. Immun.* 26: 651, 1979.
- 170.- Gulati, L.; Chaturvedi, U.C.; Mathur, A. Depressed macrophage functions in Dengue virus-infected mice: role of the cytotoxic factor. *Br. J. Exp. Path.* 63: 194, 1982.
- 171.- Görtz, J.; Brake, B.; Härle-Gupp, V.; Falke, D. Replication of HSV-1 in murine peritoneal macrophages: Comparison of various virus strains with different properties. *Arch. Virol.* 79: 173, 1984.
- 172.- Allison, A.C. On the role of mononuclear phagocytes in immunity against viruses. *Prog. Med. Virol.* 18: 15, 1974.
- 173.- Katzenstein, D.A.; Yu, G.S.M.; Jordan, M.C. Lethal infection with murine cytomegalovirus after early viral replication in spleen. *J. Infect. Dis.* 148: 406, 1983.

- 174.- Laguens, R.M.; Chambó, J.G.; Laguens, R.P. In vivo replication of pathogenic and attenuated strains of Junin virus in different cell populations of lymphatic tissue. *Infect. Immun.* 41: 1279, 1983.
- 175.- Oubiña, J.R.; Carballal, G.; Videla, C.M.; Cossio, P.M. The guinea pig model for Argentine Hemorrhagic Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 1251, 1984.
- 176.- Guala, M.C.; Lascano, E.F.; Berría, M.I.; Giovanniello, O.A. Susceptibilidad del ratón a la infección intraperitoneal con virus Junín. Papel de los macrófagos peritoneales. Resum. III Congr. Argent. de Microbiol., G-187, 1982.
- 177.- Taguchi, F.; Yamada, A.; Fujiwara, K. Factors involved in age-dependent resistance of mice infected with low virulence mouse hepatitis virus. *Arch. Virol.* 62: 333, 1979.
- 178.- Roberts, J.A. Growth of virulent and attenuated ectromelia virus in cultured macrophages from normal and ectromelia-immune mice. *J. Immunol.* 92: 837, 1964.
- 179.- Shif, I.; Bang, F.B. In vitro interaction of mouse hepatitis virus and macrophages from genetically resistant mice. II. Biological characterization of a variant virus MHV (C3H) isolated from stocks of MHV (PRI). *J. Exp. Med.* 131: 851, 1970.
- 180.- Shif, I.; Bang, F.B. In vitro interaction of mouse hepatitis virus and macrophages from genetically resistant mice. I. Adsorption of virus and growth curves. *J. Exp. Med.* 131: 843, 1970.
- 181.- Karaseva, P.S.; Khotlubei, L.I.; Elbert, L.B.; Khozinsky, V.V.; Semenov, B.F. In vitro study of the barrier function of mouse macrophages in vaccination against tick-borne encephalitis. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunol.* 12: 57, 1983.

- 182.- Turner, G.S.; Ballard, R. Interaction of mouse peritoneal macrophages with fixed rabies virus in vivo and in vitro. *J. gen. Virol.* 30: 223, 1976.
- 183.- Budzko, D.B.; Casals, J.; Walksman, B.H. Enhanced resistance against Junin virus infection induced by Corynebacterium parvum. *Infect. Immun.* 19: 893, 1978.
- 184.- Schindler, L.; Brücher, J.; Kirchner, H. Protection of mice against infection with mouse hepatitis virus type 3 by injection of silica. *Immunobiol.* 166: 62, 1984.
- 185.- Coulombié, F.C.; Coto, C.E. Modificación de la resistencia edad-dependiente del Calomys musculus a la infección intraperitoneal con virus Junín mediante el tratamiento con sílica. Resum. XXIX Reunión Científica de la Soc. Arg. de Invest. Clínica, 10, 1984.
- 186.- Campetella, O.E.; Giovanniello, O.A.; Nota, N.R. Acción de la sílica en la infección del ratón con virus Junín. Resum. IV Cong. Arg. de Microbiol., B-50, 1985.
- 187.- Zinkernagel, R.M.; Doherty, P.C. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function and responsiveness. *Adv. Immunol.* 27: 51, 1979.
- 188.- Blanden, R.V. T cell response to viral and bacterial infection.. *Transplant. Rev.* 19: 56, 1974.
- 189.- Cowing, C.; Pincus, S.H.; Sachs, D.H.; Dickler, H.B. A subpopulation of adherent accessory cells bearing both I-A and I-E or C subregion antigens is required for antigen specific murine T lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 121: 1680, 1978.

- 190.- Hahn, H.; Kaufmann, S.H.E. The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* 3: 1221, 1981.
- 191.- Lehmann-Grube, F.; Assmann, U.; Löliger, C.; Moskophidis, D.; Löhler, J. Mechanism of recovery from acute virus infection. I. Role of T lymphocytes in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from spleens of mice. *J. Immunol.* 134: 608, 1985.
- 192.- Weissenbacher, M.C.; Guerrero, L.B. de; Parodi, A.S. Acción de los inmunoseros en la Fiebre Hemorrágica experimental. *Medicina (Bs. Aires)* 28: 53, 1968.
- 193.- Nejamkis, M.R.; Nota, N.R.; Weissenbacher, M.C.; Guerrero, L.B. de; Giovanniello, O.A. Passive immunity against Junin virus in mice. *Acta virol.* 19: 237, 1975.
- 194.- Shanley, J.D.; Colin Jordan, M.; Stevens, J.G. Modification by adoptive humoral immunity of murine cytomegalovirus infection. *J. Inf. Dis.* 143: 231, 1981.
- 195.- Taguchi, F.; Yamada, A.; Fujiwara, K. Resistance to highly virulent mouse hepatitis virus acquired by mice after low-virulence infection: enhanced activity of macrophages. *Infect. Immun.* 29: 42, 1980.
- 196.- Schröder, C.H.; Engler, H.; Kirchner, H. Protection of mice by an apathogenic strain of HSV-1 against lethal infection by a pathogenic strain of HSV-1. *J. gen. Virol.* 52: 159, 1981.