

## Tesis de Posgrado

# Intervención de los mecanismos inmunológicos en el curso de la infección viral

Barrios, Hebe Alicia

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Barrios, Hebe Alicia. (1985). Intervención de los mecanismos inmunológicos en el curso de la infección viral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1969\\_Barrios.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1969_Barrios.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Barrios, Hebe Alicia. "Intervención de los mecanismos inmunológicos en el curso de la infección viral". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1969\\_Barrios.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1969_Barrios.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

\* \* \*

"INTERVENCION DE LOS MECANISMOS INMUNOLOGICOS EN  
EL CURSO DE LA INFECCION VIRAL"

AUTOR: Lic. Hebe Alicia Barrios

DIRECTOR: Dra. Nora Ruth Nota

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

\* \* \* \* \*

1985

A MI ESPOSO

A MIS PADRES

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Nora Ruth Nota por su esmerado y continuo apoyo científico que hicieron posible la culminación de esta Tesis.
- A los Dres. Octavio A. Giovannello y Silvia N. Rondinone por su inestimable colaboración, asesoramiento técnico y apoyo experimental en la realización de los experimentos presentados.
- A los Dres. Eduardo F. Lascano y María Isabel Berría por sus estudios anatomopatológicos y de co-cultivo.
- Al Dr. Juan Accorinti, Consejero de Estudios de la Carrera del Doctorado.
- A todo el personal de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, en particular a mis compañeros de laboratorio.
- Al Arquitecto Jorge M. Rampazzi por la realización de las figuras.
- A la Srta. Alcira Dussaut por su desinteresada colaboración en el dactilografiado del manuscrito.

## INDICE

ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCION.....	3
1.1. RESPUESTA INMUNE.....	3
1.1.1. En las infecciones virales.....	3
1.2. ACCION DE LA CICLOFOSFAMIDA.....	12
2. FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA.....	18
2.1. CARACTERISTICAS DEL AGENTE ETIOLOGICO.....	19
2.2. HUESPEDES EXPERIMENTALES.....	22
2.2.1. Enfermedad en el cobayo.....	22
2.2.2. Enfermedad en la rata.....	25
2.2.3. Modelo primates.....	27
2.2.4. Enfermedad en el ratón.....	28
3. MATERIALES Y METODOS.....	34
3.1. ANIMALES.....	34
3.2. CULTIVO DE TEJIDOS.....	35
3.3. VIRUS.....	37
3.4. DETECCION DE VIRUS.....	38
3.4.1. Ensayo de titulación por formación de placas (UFP).....	38
3.4.2. Co-cultivo.....	39
3.4.3. Peroxidasa - antiperoxidasa (PAP).....	41

3.4.3.1. En cortes histológicos.....	43
3.4.3.2. En cultivos de tejidos.....	44
3.5. DETECCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS.....	45
3.5.1. Prueba de neutralización.....	45
3.5.2. Prueba de fijación de complemento.....	46
3.5.2.1. Preparación del antígeno.....	46
3.5.2.2. Preparación de la escala de hemólisis.....	47
3.5.2.3. Titulación del complemento.....	47
3.5.2.4. Titulación de hemolisina.....	48
3.5.2.5. Preparación de células sensibilizadas.....	48
3.5.2.6. Titulación del antígeno.....	49
3.5.2.7. Reacción de fijación de complemento.....	49
3.5.3. Prueba de Inmunofluorescencia.....	50
3.5.3.1. Obtención de gammaglobulina de ratón.....	51
3.5.3.2. Preparación de suero de conejo antigammaglobulina de ratón.....	51
3.5.3.3. Preparación del conjugado fluorescente.....	52
3.5.3.4. Determinación de anticuerpos fluorescentes.	52
3.5.4. Cromatografía.....	53
3.6. INMUNOSUPRESION.....	54
3.7. CARACTERIZACION DE POBLACIONES CELULARES ESPECIFICAS.....	55

3.7.1. Suero anti-theta.....	55
3.7.2. Suero de cabra anti-gammaglobulina de conejo.	56
3.7.3. Suero de conejo anti-gammaglobulina de ratón.	58
3.7.4. Cuantificación de las poblaciones celulares esplénicas por inmunofluorescencia indirecta.	58
3.8. CUANTIFICACION DE LA REACCION DE HIPERSENSIBI LIDAD RETARDADA HACIA GRC POR EL METODO DE "SWELLING TEST".....	59
3.9. DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPOS HACIA GRC.....	60
3.10. ENSAYOS DE TRANSFERENCIA PASIVA.....	61
3.10.1. Humoral.....	61
3.10.2. Celular.....	62
3.11. RESPUESTA CELULAR AL VIRUS.....	63
3.11.1. Ensayos de citotoxicidad por técnica de libe ración de <sup>51</sup> Cr.....	63
3.11.2. "Swelling test".....	66
3.12. ESTUDIOS HISTOLOGICOS.....	67
3.13. ANALISIS ESTADISTICOS.....	67
4. RESULTADOS.....	68
4.1. CARACTERISTICAS DE LA INFECCION EXPERIEMNTAL DEL RATON ADULTO CON VJ.....	68
4.1.1. Morbimortalidad.....	69

4.1.2. Contenido de virus en cerebro y órganos.....	69
4.1.3. Respuesta humoral específica.....	71
4.1.4. Cinética de aparición de los linfocitos Tc en células esplénicas.....	78
4.1.5. Respuesta de HR valorada por el "swellig test".....	80
4.1.6. Acción inmunosupresora de la infección por VJ.....	84
4.1.6.1. Determinación de dosis óptima de GRC para inducir CFA y HR.....	85
4.1.6.2. Cinética de la reacción de HR.....	87
4.1.6.3. Cinética de aparición de las CFA.....	89
4.1.6.4. Respuesta humoral y celular.....	91
4.2. MODIFICACIONES EN EL CURSO DE LA INFECCION DEL RATON INOCULADO IC CON VJ PRODUCIDAS POR LA ADMINISTRACION DE DIFERENTES ESQUEMAS DE Cy....	94
4.2.1. Empleo de dosis únicas de Cy.....	95
4.2.2. Dosis fraccionadas.....	99
4.2.3. Estudios complementarios comparativos entre dosis únicas y fraccionadas de Cy.....	102
4.3. MODIFICACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE HACIA GRC INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACION DE UN ES- QUEMA FRACCIONADO DE Cy.....	116



4.3.1. Acción de la inmunosupresión sobre la respuesta humoral y celular hacia GRC.....	117
4.4. PARTICIPACION DE LA INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL EN LA RESISTENCIA DEL RATON ADULTO A LA INFECCION CON VJ.....	122
4.4.1. Inmunidad humoral.....	124
4.4.1.1. Determinación del esquema experimental de transferencia pasiva.....	124
4.4.1.2. Influencia de la transferencia pasiva de anticuerpos sobre el curso de la infección viral.....	127
4.4.1.3. Correlación entre la protección alcanzada por la transferencia pasiva de anticuerpos y el contenido viral en cerebro.....	133
4.4.2. Inmunidad celular.....	137
4.4.2.1. Ensayos de enriquecimientos de poblaciones linfocitarias esplénicas.....	137
4.4.2.2. Ensayos de transferencia pasiva celular a ratones infectados e inmunosuprimidos.....	139
4.4.2.3. Efecto de la transferencia celular sobre el contenido de virus en cerebro.....	140
5. DISCUSION.....	146
6. CONCLUSIONES.....	171
7. BIBLIOGRAFIA.....	175

## ABREVIATURAS

ACF: Adyuvante Completo de Freund  
Ac Fc: Anticuerpos Fijadores de complemento  
Ac Fl: Anticuerpos Fluorescentes  
Ac Nt: Anticuerpos Neutralizantes  
ACP: Acción Citopatogénica  
Ag: Antígeno  
CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad  
CST: Células Sensibilizadas Totales  
CS $\theta$ : Células Sensibilizadas tratadas con Suero Anti-theta  
Cy: Ciclofosfamida  
DAB: Diaminobencidina  
Dd: Dosis desencadenante  
DICT<sub>50</sub>: Dosis Infectante de Cultivo de Tejido 50  
DL<sub>50</sub>: Dosis Letal 50  
DNCB: Dinitroclorobenceno  
DO: Densidad Optica  
Ds: Dosis sensibilizante  
ev: endovenosa  
Fab: Fragmento de la inmunoglobulina fijador de antígeno  
FHA: Fiebre Hemorrágica Argentina  
GRC: Glóbulos Rojos de Carnero  
HR: Hipersensibilidad Retardada  
IC: Índice Citotóxico  
ic: intracerebral  
IFI: Inmunofluorescencia Indirecta  
Ig: Inmunoglobulina  
im: intramuscular  
ip: intraperitoneal

LAI; Líquido Ascítico Inmune  
LAN: Líquido Ascítico Normal  
LB: Linfocito B  
LCM: Virus de la Coriomeningitis Linfocitaria  
LT: Linfocito T  
Lyb: Antígeno de membrana que porta el linfocito B  
Lyt: Antígeno de membrana que porta el linfocito T  
MEM: Minimal Essential Medium  
MI: Multiplicidad de Infección  
PAP: Peroxidasa Anti-Peroxidasa  
PBS: Solución de Buffer Fosfato  
pi: post-infección  
rpm: revoluciones por minuto  
sc: subcutánea  
SF: Solución Fisiológica  
SNC: Sistema Nervioso Central  
Tc: linfocitos T con actividad citotóxica  
TSC: Buffer Tris-salino con 1% de Suero de Cabra  
Ts: linfocitos T con actividad supresora  
UFP: Unidades Formadoras de Placas  
V: Animales infectados con Virus Junín  
VJ: Virus Junín  
VXJCl3: Cepa atenuada XJCl3 del virus Junín.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. RESPUESTA INMUNE

#### 1.1.1. En las infecciones virales

En su conjunto, la respuesta inmunológica puede considerarse como un sistema adaptativo mediante el cual el organismo intenta mantener la homeostasis del medio interno respecto al externo.

En las últimas décadas las experiencias desarrolladas en el campo de la genética, bioquímica y biofísica han contribuido de manera fundamental al avance de los conocimientos de la biología y del funcionamiento del sistema inmune. La producción de anticuerpos y la respuesta inmune mediada por células, inducida por una configuración antigénica, son el producto final de una estrecha colaboración entre células presentadoras del antígeno, linfocitos derivados de la médula ósea (LB) y otra población linfocitaria con pasaje del timo (LT). Toda esta compleja interrelación celular que constituye la respuesta inmune se halla bajo control genético y es consecuencia de una serie de regulaciones precisas constituida por una red de células que interaccionan entre sí con la liberación de mediadores que concluyen con la expresión o supresión de la respuesta inmune (1).

Recientemente ha sido demostrado que la carencia de respuesta inmune es debida al menos en parte a la activación de células linfoides pertenecientes a la serie T (Ts) con función supresora. Es decir que la ausencia de respuesta es también un mecanismo activo atribuible a una particular subpoblación de linfocitos T (2).

Las diferentes subpoblaciones linfocitarias que interviene en la respuesta inmune pueden ser identificadas por marcadores de membrana presentes en la superficie celular.

Dado que los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) contiene regiones altamente comparables con las del humano, el ratón ha resultado ser uno de los animales de experimentación mejor estudiados y en el cual han podido identificarse una serie de determinantes antigénicos que caracterizan subpoblaciones linfocitarias con distinta funcionalidad.

Mientras las células productoras de anticuerpos (LB) son reconocibles por la presencia de inmunoglobulina de superficie, en la población T el marcador que la caracteriza es básicamente el antígeno theta que se halla presente a lo largo de toda la vida del linfocito en distintas concentraciones, de acuerdo a la edad del huésped.

Las especificidades antigénicas de la serie Ly fueron las primeras claramente definidas como sistemas pertenecientes a los linfocitos (3). La serie de antígenos Ly caracteriza los

linfocitos B (Lyb) ó T (Lyt).

En el caso de los Lyt circulantes básicamente tres poblaciones pueden ser consideradas. Aquellas células que presentan en su superficie los antígenos Lyt 1,2,3, los que son portadores sólo del antígeno Lyt 1, y por último el Lyt 2,3. Estas tres poblaciones representan el 50,30 y 10% respectivamente del total de linfocitos T circulantes. El componente antigénico Lyt 1 es codificado por el cromosoma 19 y los Lyt 2 y 3 por el cromosoma 6.

Esta expresión selectiva de productos genéticos incluye información que decide la funcionalidad de la población linfocitaria portadora.

Las evidencias experimentales demuestran que los linfocitos Lyt 1 "ayudan" o amplifican la actividad de otras poblaciones celulares, pueden también inducir a células precursoras a diferenciarse en efectoras de fenómenos ligados a hipersensibilidad retardada y, en los últimos años, han sido involucrados en estadios tempranos del mecanismo que conduce a la supresión de la respuesta inmune.

Por el contrario, la población portadora de Lyt 2,3 parecería estar equipada para actuar en fenómenos de citotoxicidad como también en actividades supresoras tanto de la respuesta humoral como celular (4).

Los virus, por ser parásitos intracelulares obligados, constituyen una variedad especial de agentes infecciosos. Difieren de todos los demás microorganismos por su organización, composición y mecanismos de replicación. De la manera más simplista la partícula viral completa puede considerarse formado por un genoma de ADN o ARN, rodeado de una capa proteica y en algunos casos de una envoltura externa de constitución lipídica que proviene generalmente de la célula huésped.

La infección por ciertos virus produce, tanto en el hombre como en los animales, una alteración de las funciones inmunológicas (5) (6), la que depende de las características biológicas del virus así como de la naturaleza de la célula infectada (7) (8).

Un virus puede, alternativamente, infectar células y causar su lisis (virus líticos por ejemplo poliovirus), integrarse al genoma celular y transformarlo (virus oncogénicos tales como poliovirus) o bien no causar ningún daño aparente a la célula huésped produciendo una virosis persistente (virus no citopáticos tales como el virus de la Coriomeningitis linfocitaria-LCM).

Los mecanismos de diseminación de un virus de una célula a otra susceptible pueden realizarse por lisis de la célula donde se produjo la replicación viral, con la consiguiente libe

ración de partículas infecciosas al espacio extracelular (picornavirus tales como poliovirus); por brotación de la partícula viral desde la superficie de la célula al espacio extracelular (mixovirus tales como influenza) o por contiguidad célula-célula, sin penetración en el espacio extracelular (herpesvirus tales como el Herpes simplex). La manera por la cual el virus recientemente formado es eliminado de la célula huésped condiciona la posibilidad de su neutralización por anticuerpos séricos.

Los virus están constituidos por complejos antigénicos que en muchos casos no están suficientemente definidos. Estos antígenos pueden ser componentes internos o externos del virus o determinantes antigénicos expresados sobre la superficie de la célula huésped.

Aquéllos que poseen envoltura, por ejemplo mixovirus, incorporan antes de ser eliminados por brotación, componentes antigénicos de la membrana de la célula huésped (7). Otros, particularmente los oncogénicos codifican sobre la superficie celular nuevos antígenos que no guardan relación con los componentes estructurales del virus (8). Cada uno de los antígenos virales pueden inducir respuestas inmunes específicas cuyas características dependerán de las características estructurales del antígeno y de la forma de su presentación al sistema inmune del huésped.

Las dos grandes categorías de respuesta inmune que pue-



den generarse ante una infección viral son, al igual que para otros antígenos, la inmunidad celular o humoral. La respuesta mediada por células está ligada a la presencia de linfocitos derivados del timo que en interrelaciones T-T conducen a la producción de células T sensibilizadas específicas, en este caso, hacia el antígeno viral que les dió origen.

Las distintas subpoblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmune presentan diferencias en lo que se refiere a las características fenotípicas de membrana, restricción genética, receptores o actividad biológica (9). De acuerdo a cual de las subpoblaciones activadas prime en la reacción inmune dependerá el curso de la infección viral.

La presencia de células con actividad citotóxica (Tc) produce daño de la célula huésped y el virus infeccioso contenido en su interior es expuesto a la acción de los anticuerpos neutralizantes específicos. En este proceso pueden ser alteradas también células adyacentes que no participan en la reacción. Las células Tc han sido consideradas como uno de los mecanismos más activos y temprano de eliminación viral.

Es interesante destacar que fue en la infección con el virus LCM que Zinkernagel y Doherty (10) en 1974 describieron por primera vez que la interacción Tc-célula infectada por el virus requería un reconocimiento dual, dirigido por un lado hacia el antígeno y por otro hacia productos derivados del CMH,

presentes en la superficie de las células (restricción genética)

Por otro lado, células con actividad citotóxica presentes "in vivo" generadas por la infección, son capaces de originar procesos patológicos cuyo mecanismo es homologable al de la hipersensibilidad ligada a células. También aquí el mejor ejemplo y quizás el más estudiado en las infecciones virales se relaciona al virus de la LCM.

En 1963, Rowe y col (11) presentaron la primera evidencia que el virus LCM inducía en el ratón una patología aguda mediada por células con dependencia tímica. Cole y col (12) años más tarde caracterizaron la célula sensibilizada como portadora de antígeno theta (LT) capaz de lesionar células que presentaban altas concentraciones de antígeno viral en su superficie.

Los linfocitos T sensibilizados ejercen su acción por intermedio de una serie de factores solubles capaces de actuar sobre diferentes tipos celulares. Es el caso de sustancias con actividad quimiotáctica que atraen fagocitos al área de replicación viral, factores inhibitorios de la migración de macrófagos, interferón, factores blastogénicos, etc.

En lo que se refiere a la respuesta humoral, es decir mediada por anticuerpos, puede estar dirigida hacia algunos o todos los antígenos constituyentes de la partícula viral. La funcionalidad o propiedades biológicas de los anticuerpos forma-

dos en la respuesta inmune está determinado por las características de los antígenos que los generaron y por la clase de inmunoglobulina a la que pertenecen.

Los anticuerpos con actividad neutralizante están dirigidos en general hacia estructuras virales superficiales responsables de la unión a los receptores de la célula huésped y participan en la prevención de la infección viral a otras células.

Otros anticuerpos se producen contra componentes internos de la partícula viral o bien hacia antígenos expresados en la superficie celular por acción del virus. Los anticuerpos dirigidos hacia algunos de los componentes internos son incapaces de prevenir la infección de otras células.

Dependiendo de la capacidad o no de fijar complemento los anticuerpos se comportarán como citotóxicos o no. Los anticuerpos fijadores de complemento citotóxicos son capaces de destruir las células infectadas antes que eliminen virus infeccioso al medio y como consecuencia de ello colaboran en la prevención de nuevas infecciones de las células susceptibles.

En lo que se refiere al mecanismo de acción de los anticuerpos no citotóxicos su acción sería fundamentalmente la de impedir la fijación de Tc por competición de componentes antigénicos virales presentes en la superficie de la célula infectada.

Sin embargo, la acción de los anticuerpos no es siempre beneficiosa para el organismo ya que muchas patologías se han descrito como consecuencia de la unión antígenos solubles virales-anticuerpos específicos, sobre todo en infecciones persistentes donde gran cantidad de antígeno es permanentemente liberado a la circulación (13) (14).

Finalmente, otra estrecha relación entre virus y sistema inmune es cuando el virus infecta células comprometidas en la respuesta inmune, dando como consecuencia la supresión o aumento de la respuesta (15).

En los casos en que la infección viral destruya o incapacite funcionalmente a los LB y/o los LT el resultado será la disminución o supresión de la respuesta inmune humoral y/o celular. Contrariamente, si el virus origina proliferación de las células linfoides la respuesta será en exceso con diferentes implicancias clínicas.

## 1.2. ACCION DE LA CICLOFOSFAMIDA

Las drogas citotóxicas comenzaron a emplearse durante la Primera Guerra Mundial pero fue después de la Segunda donde se hizo más amplia su utilización principalmente en el campo de la terapéutica antitumoral (16).

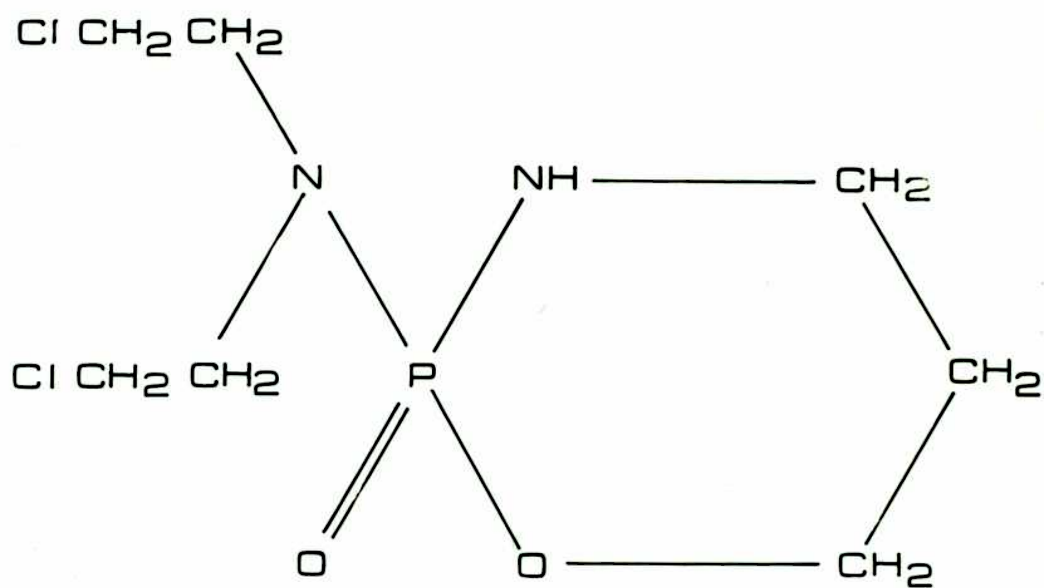
De todos los agentes alquilantes conocidos la ciclofosfamida (Cy) N-N-bis(beta-cloretil)-N'O-propilen-ácido fosfórico-esterdiamida (figura 1), un derivado de la mostaza hidrogenada, tiene, en comparación con otros agentes citostáticos de la misma serie, una mayor selectividad hacia células tumorales. Es una sustancia primariamente inactiva que necesita para ejercer su acción transformarse "in vivo" en un metabolito farmacológicamente activo, la 4-hidroxiciclofosfamida (figura 2).

Los estudios realizados por Brock y col. (17)(18) demostraron que, en todos los animales homeotérmicos, la Cy es activada en el hígado, por medio de un sistema enzimático microsomal con consumo de oxígeno y fosfato de nicotinamida adenina dinucleótico reducido ( $\text{NADPH}_2$ ). El metabolito activo llega a los tejidos periféricos así como las células tumorales, por la circulación general.

La razón de su éxito en el tratamiento antineoplásico está basado en un mecanismo de inhibición de la síntesis del ADN celular y en consecuencia en la multiplicación celular.

Figura 1

MOLECULA DE CICLOFOSFAMIDA



N\_N\_bis(beta\_cloretil)\_N'O\_propilen\_ácido  
fosfórico\_ester diamida.

Siendo las células más afectadas por la droga aquéllas que se hallan en proceso de división y, conociendo que las células tumorales crecen en forma desordenada y a un ritmo acelerado, es fácil inferir sus efectos sobre las células malignas.

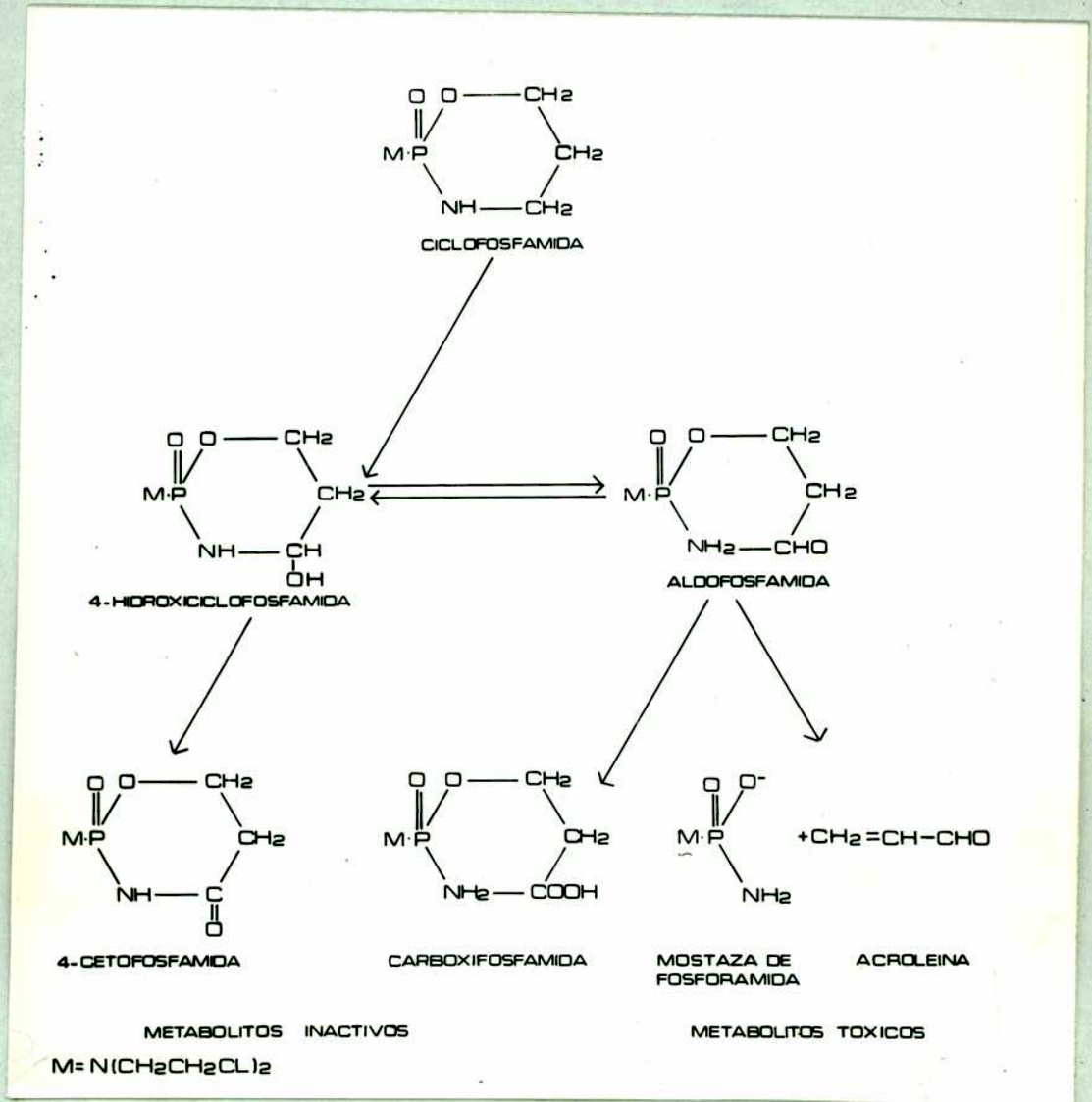
La Cy puede afectar otros tipos celulares como fagocitos mononucleares y células de la médula ósea, que poseen también un alto metabolismo de recambio. Asimismo, cuando las células del sistema inmune son activadas por un antígeno y comienzan a proliferar son también susceptibles. La droga actúa alterando su funcionalidad y causando, como consecuencia, un marcado efecto inmunosupresor.

Al conocerse las actividades descritas, la Cy comenzó a aplicarse en el tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoidea, el lupus eritematoso sistémico así como en la prevención del rechazo asociado a trasplante de órganos.

Berenbaum (19) clasifica a las drogas que afectan las células del sistema inmune en dos categorías, de acuerdo a su selectividad y tiempo de eficacia, en clase I y clase II. Las primeras, son las que poseen mayor selectividad y actúan cuando son administradas antes o después de la estimulación antigénica. En el caso de los anticuerpos, el mayor efecto se ejerce desde el día -6 al +2, considerando 0 el momento de la estimulación del antígeno.

Figura 2

Metabolismo de la ciclofosfamida





Las drogas clase II son menos selectivas que las anteriores y ejercen su acción sólo cuando son administradas durante el transcurso de la respuesta inmune. El mayor efecto supresor se obtiene cuando se administra 1 ó 2 días después del antígeno. En base a esta clasificación la Cy ha sido agrupada dentro de las drogas supresoras clase I.

Una serie de trabajos experimentales (20) (21) han demostrado que la Cy puede actuar como inmunosupresor o modulador de la respuesta inmune mediada por células B o T, dependiendo de la dosis, ritmo y momento de su administración con respecto a la sensibilización antigénica.

Los primeros trabajos de Maguin y Ettore (22) demostraron que en el modelo cobayo-dinitroclorobenceno (DNCB) la Cy aumentaba la reacción cutánea de hipersensibilidad. Posteriormente, Turk y Pouter (23) confirmaron los hallazgos anteriores que altas dosis de droga producían aumento de la respuesta celular a DNCB y describieron también inhibición de la formación de anticuerpos, atribuido esto último a la eliminación de LB de los tejidos linfoides. A partir de esas experiencias y durante muchos años quedó claramente establecido que la Cy afecta la funcionalidad del linfocito B (24) (25) inhibiendo la secreción de anticuerpos tanto para antígenos timo-dependientes como timo-independientes (26).

Estudios posteriores pusieron en evidencia que ciertas

subpoblaciones de linfocitos T eran también afectadas por acción de la Cy (27) (28) (29).

Askenase y col (30) demostraron que bajas dosis de Cy administradas el día previo a la estimulación antigénica afectaba la subpoblación de células T supresoras sin alterar la funcionalidad de los linfocitos B. Por el contrario, dosis elevadas inhibían también la producción de anticuerpos. En base a estos resultados sugirieron que los linfocitos T y B diferían en cuanto a su sensibilidad a la droga.

Las experiencias citadas constituyen los trabajos pioneros sobre la actividad de la Cy sobre el sistema inmune. A partir de ellos se han sucedido innumerables publicaciones que aportaron numerosos conocimientos sobre el correcto manipuleo experimental y clínico de la droga.

## 2. FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad endemo-epidémica de etiología viral cuyo agente etiológico es el virus Junín (VJ).

Ataca de preferencia a los trabajadores rurales en cierta época del año, durante la recolección de trigo, girasol y maíz. La onda epidémica comienza a mediados del verano y llega hasta fines de los meses fríos. Es más frecuente en los adultos de sexo masculino, pero las mujeres y niños no están exentos de contraerla.

Los huéspedes naturales de esta virosis son roedores silvestres como por ejemplo el *Calomys musculinus*, *Calomys laucha* y *Akodon azarae*, abundantes en los campos de la llanura pampeana y sus densidades de población acompañan el curso de la epidemia de FHA (31) (32) (33).

Experimentalmente se ha podido inducir la enfermedad en diferentes animales tales como cobayo, ratones, ratas y primates, con la finalidad de reproducir la enfermedad humana y poder estudiar de este modo los mecanismos responsables de la patología.

## 2.1. CARACTERISTICAS DEL AGENTE ETIOLOGICO

El virus Junín fue aislado en 1958 por Parodi y col. a partir de materiales de necropsia de un enfermo procedente de la ciudad de Junín (34) (35).

Recién en 1970 se lo agrupó dentro de los Arenavirus en base a estudios serológicos, biológicos y morfológicos (36) (37). Este grupo se encuentra integrado por el virus de la Coriomeningitis linfocitaria, el virus Lassa y el complejo Tacaribe en el cual se encuentran los virus Amaparí, Junín, Latino, Machupo, Paraná, Pichindé, Tacaribe y Mamiami.

En algunas propiedades físicas y químicas (tamaño, morfología, labilidad al éter y solventes lipídicos y respuesta a los inhibidores de los ácidos nucleicos) es semejante a aquellas descritas para Arenavirus.

El tamaño del virus, determinado por microscopía electrónica (38) oscila entre 60 y 150 milimicrones.

Posee ARN (39) que por ser digerido por ribonucleasa in dica que se trata de un ARN de cadena simple (40). Por electroforesis en gel de poliacrilamida se vio que el ARN, a semejanza de los otros virus pertenecientes al mismo grupo, está constituido por cuatro constituyentes mayores y tres menores (41). Posee además seis polipéptidos de los cuales cuatro son glicopéptidos. El componente predominante es no glicosilado y per-

manece asociado al ARN viral después del tratamiento con ciertos detergentes no iónicos como el tritón X-100, por lo que parece funcionar como nucleoproteína. El peso molecular es de 64.000 daltons y corresponde a la proteína 72.000 del virus Pichindé. De los cuatro glucopéptidos el más notable es extraíble con tritón X-100 y corresponde a la glucoproteína de envoltura, con un peso molecular de 38.000 daltons y estaría ligada a la producción de anticuerpos neutralizantes específicos. La localización de los restantes glucopéptidos de 91.000, 72.000 y 52.000 y la de la proteína menor de peso molecular 25.000 no ha sido totalmente determinada.

Los estudios por microscopía electrónica (42) (38) (43) a partir de cultivos celulares u órganos de animales infectados son coincidentes en afirmar que la partícula viral es pleomórfica, posee envoltura y es eliminada de la célula por un mecanismo de brotación. En un estudio detallado de las células infectadas se pudo observar en la zona cercana a la periferia celular un engrosamiento que daría lugar al ensamblaje y a la formación del brote con acúmulo de partículas densas de 20 a 25 nanómetros similares en tamaño y forma a los ribosomas. Al emerger la partícula viral de la célula infectada queda ligada a ella por un pedículo y los pequeños gránulos situados cerca de la zona de brotación quedan incluidos dentro del virus. La brotación puede producirse aún en pleno proceso de mitosis de

las células (38). Algunos autores (44) consideran que el ensamblaje puede realizarse no sólo en la zona de brotación sino también en el citoplasma de la célula.

La partícula viral está constituida por una zona central llamada núcleo o core. El núcleo presenta a su vez una zona central menos densa donde están incluidos los gránulos semejantes a ribosomas y una periferia densa y compacta que se confunde con la zona interna de la membrana que rodea a la partícula viral (38).

## 2.2. HUESPEDES EXPERIMENTALES

### 2.2.1. Enfermedad en el cobayo

El cobayo, hasta la actualidad, es el huésped que mejor reproduce la forma hemorrágica de la enfermedad humana. Estos animales inoculados con 100 a 1000 DL<sub>50</sub> de la cepa XJ, aislada por Parodi y que ha sufrido varios pasajes en el laboratorio, mata a los mismos en el 100% de los casos entre los 10 y 18 días post-infección (pi) (45). Las vías de inoculación pueden ser varias: intramuscular (im), intranasal, subcutánea (sc), intracerebral (ic), intraperitoneal (ip) y por escarificación de la piel, demostrando en todos los casos similar susceptibilidad a la infección.

Los signos de enfermedad en hipertermia a partir del 5° día que aumenta progresivamente y que llega a ser de 2°C más que en los animales controles (temperatura normal 38,5°C) para luego caer en una marcada hipotermia en la etapa final de la enfermedad. La pérdida de peso se hace significativa a partir del día 8 pi y en los estadios finales la caída llega a superar el 20% de los valores iniciales (45) (46).

En las autopsias se observan signos característicos que, en conjunto, se han denominado cuadro típico de la enfermedad en el cobayo. Los mismos incluyen petequias en piel y tejido celular subcutáneo, hemorragias y petequias en intes-

tino delgado y grueso, suprarrenales y mucosa bucal. Es frecuente la observación de adenopatías hemorrágicas así como condensación pulmonar. Por microscopía óptica y electrónica se pudieron determinar las características de las lesiones producidas por el virus en diferentes órganos y en algunos casos se ha visualizado la partícula viral (47) (48) (49) (50).

Los datos que emanan del estudio hematológico muestran, a semejanza con la enfermedad humana, leucopenia, linfopenia y plaquetopenia (51) (52). Existen, asimismo, importantes alteraciones en la coagulación y activación del complemento sérico (53). El medulograma demuestra inhibición de formación y maduración de la serie blanca, aumento posiblemente relativo de la serie roja y disminución de los megacariocitos (47) (48).

La viremia es temprana, ya que puede aislarse virus a partir del día 2 pi y persiste hasta la muerte del animal. Los títulos aumentan durante el transcurso de la enfermedad desde aproximadamente  $10^{1.5}$  DL<sub>50</sub>/ml al 4° día hasta  $10^{4.47}$  DL<sub>50</sub>/ml en el día 9 pi, y  $10^{5.5}$  DL<sub>50</sub>/ml poco antes de morir (45). El momento de aparición del virus en sangre ha sido también confirmado por estudios de inmunofluorescencia (54). El virus puede aislarse además de órganos tales como ganglio a partir del día 3° pi, bazo, pulmón y suprarrenales a partir del día 7° pi, y de corazón, hígado y riñón a partir del día 11 pi. No pudo aislarse virus en muestras tomadas de cerebro (46).



La eliminación del virus por orina, en general, es tardía y aparece sólo en muestras tomadas del período terminal aunque en algunos casos puede ser detectada a partir del día 7-8 pi. No pudo aislarse virus de heces en ninguno de los esta días de la enfermedad. En fauces es posible aislarlo a partir del día 9° pi (46).

El virus induce una inmunosupresión hacia antígenos no relacionados (55) y hacia el mismo virus ya que no se detectan anticuerpos humorales específicos durante todo el transcurso de la enfermedad (56).

Por otra parte, los animales infectados presentan dismi nución de las pruebas cutáneas de inmunidad celular hacia antígenos proteicos observándose un descenso de LT en bazo, ganglios y sangre periférica, no mostrándose alteraciones de los LB (57).

El estudio histológico indica la existencia de una hiperplasia reticular con depleción linfocitaria y necrosis de ganglios linfáticos, bazo y médula ósea (58). El hecho de que exista una estrecha correlación entre lesiones histológicas, localización del antígeno viral por técnicas de inmunofluores cencia y título de virus infeccioso en el tejido linfohemopo-yético de los animales infectados, sugiere un efecto citopático directo del virus sobre este tejido. Esto se ve corroborado por la ausencia de infiltrado de células mononucleares en las

lesiones (56), la ineficacia del suero antilinfocítico para modificar el curso de la enfermedad (59) y la ausencia de depósitos renales de inmunoglobulinas ó  $C_3$  (60).

La mayoría de estos hallazgos son coincidentes con los encontrados en la FHA humana, en la cual también se postula un mecanismo de acción directo del virus (61).

#### 2.2.2. Enfermedad en la rata

La rata Wistar, mutante de la Norvegicus, inoculada con VJ, muestra una estrecha relación entre la edad del animal y la susceptibilidad al virus.

Los animales inoculados por vía ic con 1000  $DL_{50}$  de VJ cepa XJ (62) a las 6, 24 y 48 horas presentan una mortalidad del 18,3 y 5% respectivamente, siendo del 0% en los animales de 3 días de vida, luego se incrementa a medida que aumenta la edad del animal (5 días 31%; 10 días 93%) para disminuir nuevamente y alcanzar a los 26 días de vida una mortalidad del 0%.

Los animales que mueren lo hacen entre los días 14 y 20 pi con un cuadro neurológico semejante al del ratón lactante y sin hemorragias.

El título de virus en cerebro alcanza en los animales de 2 a 10 días de vida valores de aproximadamente  $10^7$   $DICT_{50}/ml$

Los animales que no mueren desarrollan anticuerpos que aparecen a los 15 días pi y que alcanzan índices neutralizantes superiores a los  $10^{5.2}$  DICT<sub>50</sub>/ml después de los 30 días pi.

No pudo observarse diferencias significativas en los valores hematológicos de los animales infectados a los 10 días de vida, en comparación con los controles sin infectar.

Histológicamente se puede correlacionar el grado de lesión cerebral y cerebelar con la mortalidad. Los animales de 2 días de vida (5% de mortalidad) presentan sólo discretas alteraciones histológicas mientras que en los animales de 10 días de vida (93% de mortalidad) se observa en cerebro un intenso infiltrado mononuclear localizado en subaracnoides y espacios perivasculares que en etapas posteriores muestran áreas de neurolisis y desmielinización.

El análisis inmunohistoquímico de la rata de 2 días mostró la presencia de antígeno viral en el citoplasma de las células neuronales a partir del día 3 pi persistiendo en menor magnitud hasta los 30 días pi (63).

En animales infectados estudiados hasta los 9 meses pi, en los que solamente pudo aislarse virus infeccioso de encefalo por técnicas de co-cultivo, se detectó antígeno viral por inmunomarcación enzimática en neuronas de la corteza, núcleos de la base, cerebro, protuberancia y bulbo (64) con presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes. Estas

observaciones indican el desarrollo de una infección crónica con atrofia cerebelosa en estos animales.

Los resultados mencionados sugieren que la multiplicación de virus en cerebro de la rata no implica acción citopática que conduzca a la muerte de los animales, pues tanto en las ratas infectadas a los 10 días, el virus replica alcanzando los mismos niveles en cerebro, pero sólo las ratas de este segundo grupo mueren (63) (62).

### 2.2.3. Modelo primates

Las cinco especies de primates estudiadas hasta el momento son: *Alouatta carayá*, *Saimiri sciureus*, *Aotus trivirgatus*, *Cebus sp* y *Callithrix jacchus*.

En las tres primeras, la infección producida por la cepa XJ no se traduce por manifestaciones clínicas ni por alteraciones hematológicas estadísticamente significativas. El aislamiento de virus a partir de órganos y sangre resultó negativo y la infección sólo se evidencia por la aparición de anticuerpos neutralizantes séricos (65) (66) (67).

El *Cebus sp* desarrolla una enfermedad no mortal caracterizado por poliadenopatías, pérdida de peso, leuco-plaquetopenia, presencia de virus en sangre y fauces y aparición de anticuerpos. En algunos casos pueden presentar un cuadro neurológico tardío con depósito de inmunoglobulina y  $C_3$  en estructu

ras vasculares del SNC (68).

En el *Callithrix jacchus* la infección viral induce una enfermedad grave con signos hemorrágicos y neurológicos que por lo general lo conducen a la muerte entre los 17 y 24 días pi con altos títulos de virus en sangre y órganos, especialmente en tejido nervioso y hemapoyético. Anatomopatológicamente presentan meningoencefalitis y vasculitis de intensidad variables en pulmón, hígado, tejido linfático y médula ósea (69).

Asimismo se detecta en estos órganos la existencia de antígeno viral por técnicas de inmunofluorescencia (70).

Todos estos hallazgos indican que este primate desarrolla una infección similar en muchos aspectos a la FHA humana.

#### 2.2.4. Enfermedad en el ratón

El ratón, otro de los huéspedes experimentales más estudiado en la FHA, se comporta de manera diferente según la edad del mismo.

El ratón lactante de 24-48 horas de vida, a diferencia del adulto, es muy susceptible a la inoculación con VJ como lo demuestran los trabajos de Parodi y col (35), Pirosky y col (71). Cuando el virus es inoculado por vía ic, produce una enfermedad encefalítica con marcados signos neurológicos y con una mortalidad que alcanza el 90-100% entre los

días 7 a 27 pi con un máximo entre los días 12 a 15. Otras vías de inoculación como ser la sc o ip han demostrado iguales efectos pero en menor proporción que la vía ic (88 y 60% respectivamente) (72) (73).

Es de destacar que a diferencia de lo que ocurre en el cobayo, el ratón no presenta manifestaciones hemorrágicas y las características de la enfermedad son similares cualquiera sea la cepa murina empleada (Rockland, CFW, C<sub>3</sub>H, Balb/c, etc.).

La distribución de virus en órganos demuestran que los títulos más altos se detectan en cerebro en el día 7° pi ( $10^{7,0}$  DICT<sub>50</sub>/ml), niveles que se mantienen hasta la muerte de los animales. El aislamiento en otros órganos sólo es positivo después del 7° día pi. La viremia comienza a detectarse a partir del 3° y hasta el día 10° pi con títulos que no superan los  $10^{3,5}$  DICT<sub>50</sub>/ml.. El comienzo de las manifestaciones clínicas coincide en general con la invasión generalizada del organismo y el virus puede ponerse de manifiesto en bazo, hígado y riñón (72).

Los valores hematológicos no sufren variaciones tan marcadas como el cobayo aunque puede observarse una leucopenia con linfopenia estadísticamente significativa después del 10° día pi y hasta la muerte de los animales (74).

En los ratones infectados los anticuerpos fijadores de complemento aparecen alrededor del día 10-15 pi y no es posible obtener anticuerpos neutralizantes hasta el momento de la muerte.

En los animales sobrevivientes es posible detectar anticuerpos neutralizantes alrededor de los 20 días pi los que parecerían mantenerse al igual que los fijadores de complemento por períodos prolongados (74).

El VJ induce bajos niveles de interferón y al parecer no juega ningún papel de importancia en la evolución de la infección (75).

La histopatología del cerebro de los animales sacrificados entre los 12 a 15 días pi, muestran coroiditis, hiperplasia glial, vasculitis y perivasculitis con infiltrado de células mononucleares (76). Mediante la técnica de inmunofluorescencia se visualiza antígeno viral en el citoplasma de las neuronas corticales y en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos desde el 7° día pi.

El estudio de la microscopía electrónica demuestra la presencia de partículas virales brotando de neuronas pericapilares y astrocitos (77).

Las lesiones observadas en el cerebro del ratón lactante son atribuidas por la mayoría de los autores (78) (79) (80) (81) a una reacción del sistema inmunológico semejante al descrito en la encefalitis alérgica experimental, para lo cual sería necesario la integridad del sistema inmune timo dependiente.

Las bases experimentales que permiten esta afirmación pue

den resumirse como sigue:

La timectomía practicada dentro de las primeras 24 horas de vida permitió una sobrevida del 100% de los animales inoculados con 1.000 DL<sub>50</sub> de VJ no mostrando signos clínicos de infección viral (80) (82).

Trabajos posteriores utilizando inmunosupresores confirmaron estas presunciones.

Uno de los más potentes inmunosupresores de la hipersensibilidad mediada por células, es sin duda el suero antilinfocito o específicamente el antitimocito (SAT) (78) (79).

En el grupo de animales lactantes que recibió SAT en distintos esquemas y a diferentes momentos con respecto a la infección viral, se obtuvo una sobrevida de alrededor del 30% y los que murieron lo hicieron con una evidente prolongación del tiempo de sobrevida con respecto a los controles, ya que el 50% de mortalidad se alcanzó a los 32 y 13 días respectivamente.

Los animales controles y los inmunosuprimidos con SAT fueron estudiados en lo referente a título de virus en cerebro y anticuerpos neutralizantes.

Pudo comprobarse que los títulos de virus en cerebro no mostraron diferencias entre los distintos grupos. Tanto en los tratados como en los no tratados (timectomía o suero) el título fue similar a pesar de que los animales infectados sin tratamiento



morían en el 97,5%. Esto permitió afirmar que la replicación del virus en cerebro no era la causa directa de la enfermedad. Los anticuerpos neutralizantes fueron detectados a partir de los 37 días pi (83) (82).

Los estudios anatomopatológicos de los animales timectomizados o tratados con SAT no mostraron las lesiones características (82) de la encefalitis producida por VJ, lo que apoyó aún la idea que la patogénesis tenía etiología inmunológica.

En apoyo de la etiología celular de la enfermedad del ratón por VJ están también los ensayos de transferencia de células linfoides provenientes de animales adultos inoculados con virus. Por el ensayo con  $^{51}\text{Cr}$  pudo demostrarse que, pese a no sufrir la enfermedad, en ciertas condiciones los ratones adultos se sensibilizan al virus (83) (84).

La transferencia de éstas células sensibilizadas al ratón lactante infectado produce un acortamiento en el tiempo de sobrevida de los animales demostrando que las células linfoides están comprometidas en las lesiones que producen la muerte de los animales (83) (85).

El ratón adulto inoculado con VJ por vía ic, en contraposición a lo que ocurre con el ratón lactante, no enferma y produce anticuerpos neutralizantes contra el virus a partir de los 20 días pi, que se mantienen hasta los 7 meses pi, encontrándose ade-

más grandes variaciones individuales (86) como así también modificaciones en los niveles de anticuerpos en función del tiempo pi.No se aísla virus en cerebro más allá de los 10 días pi y la viremia resulta sistemáticamente negativa (73).La mortalidad de este grupo de animales alcanza solamente el 5-10% de los casos.

Experiencias utilizando inmunosupresores demostraron que la resistencia del ratón adulto al virus podría ser revertida (87) (88).De las drogas empleadas la Cy resultó la más efectiva ya que administrada en dosis y ritmo adecuado produjo una mortalidad superior al 80%,lo que sugiere la participación del sistema inmune en la resistencia al virus.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. ANIMALES

Ratones: Todos los experimentos descriptos en esta Tesis requirieron el uso de animales endocriados, ya sea para efectuar estudios de transferencia celular o para ensayos "in vitro" en las cuales la histocompatibilidad es mandatoria. Se utilizaron animales exocriados únicamente para la preparación y titulación de virus empleado, o para obtener el antígeno fijador de complemento que se utilizó en las reacciones serológicas. Las cepas endocriadas Balb/c y C3H fueron provistas por la Comisión Nacional de Energía Atómica. Todos los animales se mantuvieron en el bioterio de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, UBA, administrándoles dieta balanceada, de origen comercial y agua acidulada (HCl al 0,3%) "ad libitum".

Conejos: Albinos de 2-3 kg de peso, hembras o machos obtenidos de distintos bioterios.

Cabra: Adulta de un peso aproximado de 35 kg.

Carneros: De raza criolla, de 12 a 18 meses de edad provenientes del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Castelar).

Luego de realizar ensayos previos con glóbulos extraídos de 10 animales diferentes y dado que existían variaciones individuales, se utilizaron en todas las experiencias descritas sólo los de un animal para mantener la uniformidad de los ensayos. Los glóbulos rojos de carnero (GRC) empleados fueron obtenidos por punción de la vena yugular, recogidos en solución de Alsever con antibióticos al 2% (estreptomycin-penicilina) y conservados a 4°C. En todos los experimentos los GRC fueron siempre empleados dentro de los 20 días de su obtención.

Previo a su uso, los GRC fueron lavados 3 veces en solución fisiológica (SF) por centrifugación durante 10 minutos. Después del último lavado las células fueron contadas en cámaras de Neubauer y ajustadas a diferentes concentraciones según las necesidades.

Cobayos: De 250-400 gr de peso, procedentes de diferentes bioterios. Se usaron como dadores de suero fresco, para ser utilizados como fuente de complemento.

### 3.2. CULTIVO DE TEJIDOS

Células Vero: Línea continua de riñón de mono verde africano (Cercopithecus aetiops) (89). Las células Vero son permisivas para la replicación del VJ y produce en ellas una acción citopato

génica (ACP) característica, que se pone de manifiesto al 4°-5° día pi. Las células fueron usadas en monocapas confluentes preparadas en placas o en tubos, para los ensayos de titulación de virus y de anticuerpos neutralizantes. La línea celular se mantuvo mediante dos repiques semanales utilizando como medio de crecimiento MEM (Minimal Essential Medium) (90) con el agregado de aminoácidos no esenciales (91) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml), suplementado con 5% de suero de ternera inactivado.

Células L929: Línea continua derivada de tejido conectivo de ratón C3H/An (92). Estas células se utilizaron para los ensayos de citotoxicidad por liberación de Cr<sup>51</sup>. Las células fueron mantenidas en medio TC 199 (Gibco) suplementado con 10% de suero de ternera inactivado, con el agregado de antibióticos.

Células BHK-21: Línea continua proveniente de riñón de hamster lactante (Syrian o Golden, Mesocricetus auratus) (93).

Fueron utilizadas en la preparación de microcultivos en tubos Leighton usados como sustrato para la detección de anticuerpos fluorescentes. Las células se mantuvieron en medio MEM-Glasgow BHK-21 (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino de recién nacido y antibióticos.

Obtención de suspensiones celulares: Cuando las botellas destinadas al crecimiento de células mostraron un desarrollo adecuado, la monocapa confluyente fue lavada cuidadosamente con medio Hanks para eliminar los restos del suero. A continuación, las células se trataron con 10 ml de solución de tripsina al 0,25% y las botellas fueron incubadas de manera invertida, a 37°C. Cuando las células comenzaron a desprenderse del vidrio se agregó a las botellas 1 ml de suero de ternera para detener la acción de la tripsina e inmediatamente se les agregó medio de mantenimiento.

Las células así obtenidas se emplearon para repiques a otras botellas o para la siembra de tubos o placas.

### 3.3. VIRUS

Cepa: Patógena XJ prototipo del virus Junín (VJ) (Catalogue of Arthropod-Borne-Viruses N° 77).

Esta cepa, aislada originalmente en 1958 a partir de la sangre de un enfermo de FHA (34), fue mantenida por sucesivos pasajes en animales de laboratorio. En este trabajo se utilizó la cepa luego de 2 pasajes en cobayo, 13 en ratón lactante, 25 en cobayo y 16 en ratón lactante.

Preparación del stock: Se obtuvo a partir de ratones albinos

lactantes Rockland, los que fueron inoculados por vía ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ cepa XJ, contenidas en 0,2 ml de Hanks.

Una parte de los animales inoculados se sacrificaron por decapitación 7 días después de la infección, cosechándose los cerebros en forma estéril, los que se almacenaron a -70°C. El resto, 2-4 ratones de cada camada (20 animales en total), fue utilizado como control de la infección observándose diariamente la aparición en ellos de signos clínicos de la enfermedad. Una vez comprobada la eficacia de la infección, se procedió a la preparación del stock de virus. Para ello, con los cerebros descongelados se preparó un homogeneizado al 10% P/V en solución de Hanks. El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 45 minutos en frío (4°C) y el sobrenadante, fraccionado en alícuotas de 0,5 ml, fue conservado a -70°C. La infectividad del stock así preparado se determinó en células Vero, calculándose las unidades formadoras de placas (UFP) o la dosis infectante para cultivo de tejidos 50 (DICT<sub>50</sub>), y en animales lactantes la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), por el método de Reed y Muench (94).

### 3.4. DETECCION DE VIRUS

#### 3.4.1. Ensayo de titulación por formación de placas (UFP) (95)

Dos mililitros de una suspensión de  $2,5-3 \times 10^5$  células

Vero en medio de crecimiento, fueron sembradas en cada una de las 6 cavidades (35 mm de diámetro y fondo plano) de policubetas descartables (Linbro Tissue Culture Plate, Cat. N° 76-037-05). Inmediatamente, las placas fueron incubadas una noche a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Antes de las 24 hs de sembradas, las células se infectaron con 0,1 ml de las diluciones del material a titular, dejándose adsorber el inóculo durante 60 minutos a 37°C; luego se cubrieron con 2 ml de medio de mantenimiento conteniendo metilcelulosa al 0,8% y las policubetas se incubaron nuevamente a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. A los cinco días se agregó a cada cubeta 1,5 ml de medio fresco sin metilcelulosa. El revelado de la formación de placas se hizo al 7° día, tiñendo las monocapas durante 1 hora con cristal violeta al 0,02%, en una solución de formol al 10%.

El título de cada muestra fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

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

N: número de placas; D: dilución inoculada; V: volumen del inóculo

#### 3.4.2. Co-cultivo

Esta técnica, altamente sensible para la detección de vi



rus, fue descrita por Horta-Barbosa y col. en 1969 (96) y modificada más tarde por Gilden y col. (97) y Carrigan y col. (98).

Consiste en poner en contacto el material, ya sea de órganos, tejidos o flúidos, en los cuales se quiere detectar la presencia viral, sobre una monocapa de células permisivas con el agregado de medio de cultivo bajo condiciones experimentales apropiadas para que el virus se replique.

El contenido viral se determina por la ACP producida por el virus sobre la monocapa y/o por inmunomarcación enzimática con el sistema peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).

En la técnica empleada se siguieron los siguientes pasos: como células permisivas se utilizaron células Vero ya que en ellas el virus Junín produce ACP. Las células Vero fueron tripsinadas, centrifugadas y contadas en cámara de Neubauer ajustándolas a una suspensión de  $1 \times 10^5$  cél/ml en medio de crecimiento.

Los órganos provenientes de los ratones infectados, fueron extraídos estérilmente, cortados en pequeños trozos y colocados en cajas de Petri conteniendo antibióticos y luego lavados minuciosamente con PBS tratando de disociar los tejidos con la ayuda de una pipeta. En el caso particular de las muestras de sangre, la extracción se realizó por punción cardíaca y fue recogida en tubos conteniendo 0,2 ml de heparina diluída 1/10 en SF con el agregado de antibióticos.

Las suspensiones celulares procedentes de los distintos

Órganos se resuspendieron en MEM Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino. Una suspensión de estas células mezclada con partes iguales de células Vero obtenidas como se indicó anteriormente, fue sembrada en tubos de Leighton e incubada a 37°C.

Los co-cultivos fueron examinados diariamente cambiando el medio en caso necesario. Los tubos Leighton que contenían muestras de sangre fueron lavados a las 24 hs de incubación, agregándoles medio fresco para eliminar los restos celulares que resultaran tóxicos para el cultivo.

Después de 7-12 días de incubación los co-cultivos fueron observados para detectar la presencia de ACP. En el caso de resultados negativos las monocapas se tripsinaron y subcultivaron en nuevos tubos de Leighton hasta 5 repiques sucesivos tratando con ello de aumentar la posibilidad de replicación viral.

El sobrenadante de los co-cultivos, así como el homogeneizado de órganos y sangre fueron inoculados alternativamente en cultivos de células Vero para la determinación de UFP, o bien en ratones lactantes con el objeto de detectar virus infeccioso.

#### 3.4.3. Peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (99)

Esta técnica fue utilizada para la detección de antígeno (Ag) viral, ya sea en las muestras provenientes de cortes histo-

lógicos o en co-cultivos.

El principio de esta técnica se basa en la utilización de una enzima, peroxidasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno. Si la solución de  $H_2O_2$  contiene además diaminobencidina (DAB), el oxígeno liberado por la acción de la peroxidasa, oxigena el DAB dando origen al óxido de DAB el cual es insoluble y produce un precipitado de color marrón rojizo, fácilmente visualizable. Con la finalidad de aumentar la sensibilidad del método se utilizó la técnica indirecta de PAP. Para la identificación de Ag Junín, los preparados se hicieron reaccionar con un antisuero específico anti-virus, preparado en conejo. Luego, como segundo antisuero, se utilizó suero de cabra anti-suero de conejo el cual, agregado en exceso, deja una rama libre del fragmento Fab para reaccionar con el tercer antisuero. Este, fue suero de conejo anti-peroxidasa, el cual, antes de su uso, se conjugó con peroxidasa para formar un complejo PAP.

Incubando los preparados con este complejo en una solución conteniendo  $H_2O_2$  y DAB, la reacción positiva se evidencia por un depósito de color marrón rojizo (óxido de DAB), el que se visualizó fácilmente bajo microscopio óptico.

Los pasos que se siguieron para la realización de esta técnica dependieron del material a analizar.

### 3.4.3.1. En cortes histológicos

Las muestras fijadas en medio Bouin deshidratadas en etanol con graduaciones crecientes hasta 100° y aclaradas con xilol, fueron posteriormente incluidas en parafina. Los cortes obtenidos por micrótomos se fijaron por secado en portaobjetos y se desparafinaron con varios cambios de xilol y alcohol. Para eliminar la peroxidasa endógena, los preparados fueron sometidos a incubación con metanol conteniendo peroxidasa al 10% durante 30 minutos. Los cortes fueron sumergidos en etanol 96° y 80° y lavados en abundante agua destilada y buffer tris salino (0,05 M pH 7,6) conteniendo 1% de suero de cabra (TSC) durante 10 minutos. A continuación los preparados se secaron cuidadosamente alrededor de las secciones y se cubrieron luego con el primer antisuero (suero de conejo anti-VJ diluido 1/50) dejándolo actuar durante 30 minutos. Pasado ese tiempo de incubación, los portaobjetos fueron lavados en TSC permaneciendo durante 2 horas en el mismo buffer. El segundo antisuero, suero de cabra anti-IgG de conejo, (Cappel Lab., Downingtown, Pa, U.S.A.) diluido al 1/100 fue adicionado en las mismas condiciones que el anterior. Luego del lavado de los portaobjetos con TSC, se cubrieron con el tercer antisuero, suero de conejo antiperoxidasa diluido 1/100 (Cappel Lab.), durante 30 minutos a temperatura ambiente, agregando en el último lavado una solución conteniendo 0,03%

de DAB (Fluka AG, Chemische Fabrick, Buchs, Switzerland) y 0,05% de  $H_2O_2$ . Este paso se realizó bajo control microscópico hasta obtener buena tinción.

El revelado se interrumpió con agua destilada y posteriormente a cada portaobjeto se le agregó una gota de tetróxido de osmio al 0,10% durante 2-4 segundos, seguido de varios lavados con agua destilada. Como controles se utilizaron preparados a los que se les agregó suero normal de conejo en lugar del primer antisuero.

#### 3.4.3.2. En cultivo de tejidos

Para la realización de la técnica de PAP, se utilizaron en este caso, cultivos celulares sobre cubreobjetos de tubos Leighton provenientes de muestras de co-cultivos.

Las células fueron fijadas con metanol durante dos minutos en hielo seco. Los cubreobjetos, previamente secados sobre papel de filtro, se lavaron con TSC y luego de secados nuevamente, fueron cubiertos con el primer antisuero (suero de conejo anti-VJ) durante 30 minutos, lavados con TSC, secados y revelados como se describió anteriormente.

### 3.5. DETECCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS

#### 3.5.1. Prueba de neutralización

Se utilizó la técnica de suero diluido-virus constante.

Las muestras de suero diluidas 1/5 con líquido de Hanks fueron inactivadas a 56°C durante 30 minutos y centrifugadas a 10.000 rpm durante 45 minutos a 4°C. Luego de realizar las diluciones en medio de mantenimiento, 0,5 ml de cada dilución se mezclaron con el mismo volumen conteniendo  $4 \times 10^3$  DICT<sub>50</sub>/ml de VJ, se incubaron 1 hora a 37°C. Como controles, se utilizaron mezclas conteniendo la misma cantidad de virus en 1 ml de medio de cultivo.

Las monocapas de células Vero sembradas en tubos de ensayo, se infectaron con 0,2 ml de las diluciones de suero utilizando 4 tubos por dilución. El inóculo se dejó adsorber 1 hora a 37°C y al término de la adsorción, se agregó a los cultivos 1 ml de medio de mantenimiento reincubándose nuevamente durante una semana.

El título neutralizante del suero se expresó como la mayor dilución capaz de impedir la aparición de ACP en el 50% de los cultivos de células Vero.

### 3.5.2. Prueba de fijación de complemento

#### 3.5.2.1. Preparación del antígeno (100)

Ratones de 24-48 hs de vida de la cepa Rockland, fueron inoculados por vía ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ cepa XJ. A los 7 días, los animales se sacrificaron y sus cerebros se congelaron inmediatamente a -70°C.

En el momento de preparación del Ag, los cerebros fueron descongelados, determinando su peso neto y homogeneizados con 4 volúmenes de una solución de sacarosa al 8,5%. Una vez obtenido el homogeneizado, se procedió a la deshidratación agregando por cada volumen de homogenato 20 volúmenes de acetona. El macerado se agitó dejándolo reposar 1 hora en frío y luego se centrifugó a 1.800 rpm durante 8 minutos a 4°C.

La acetona se eliminó por evaporación empleando una bomba de agua y al sedimento se le adicionó un volumen igual de acetona, repitiéndose el procedimiento descrito dos veces consecutivas.

El sedimento así obtenido fue pulverizado en mortero y colocado en una botella formando una fina capa, la que se conectó a una bomba de vacío para evaporar los restos de acetona. Al residuo seco así obtenido se le agregó ClNa 0,15 M estéril, en un volumen aproximado al doble del peso seco de los cerebros,

disolviéndolo bajo agitación una noche a 4°C. La solución restante fue centrifugada en frío a 10.000 rpm 60 minutos y el sobrenadante, fraccionado en alícuotas de 0,2 ml y congelado a -70°C, fue utilizado como Ag.

### 3.5.2.2. Preparación de la escala de hemólisis

Para su realización, 1 ml de una suspensión de GRC al 2,8% se mezcló con 7 ml de agua destilada. La suspensión de hematíes se agitó hasta obtener lisis total y luego se agregó al tubo de ensayo 2 ml de buffer veronal 5 x, para restaurar la osmolaridad (tubo A). En un segundo tubo, a 1 ml de la suspensión de GRC al 2,8%, se le agregó 9 ml de buffer veronal 1 x (tubo B).

La escala de hemólisis se confeccionó mezclando distintos volúmenes de los tubos A y B según el siguiente protocolo:

% de hemólisis	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Tubo A (ml)	0	.1	.2	.3	.4	.5	.6	.7	.8	.9	1
Tubo B (ml)	1	.9	.8	.7	.6	.5	.4	.3	.2	.1	0

Esta escala fue utilizada para los ensayos de titulación del complemento y para la prueba de fijación de complemento.

### 3.5.2.3. Titulación del complemento

Como fuente de complemento se empleó una mezcla de sueros provenientes de por lo menos 10 cobayos adultos. Para su titula-



ción se utilizaron 8 tubos conteniendo volúmenes crecientes comprendidos entre 0,005 y 0,5 ml, de las diluciones de complemento, completando el volumen a 1 ml con buffer veronal. Luego a cada tubo, se le adicionó 0,2 ml de la mezcla hemolítica y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Para facilitar la lectura, los tubos se centrifugaron 10 minutos a 1000 rpm, determinándose el porcentaje de hemólisis según la escala patrón preparada previamente. Los datos obtenidos fueron graficados en papel doble logarítmico, para calcular el 50% de hemólisis.

#### 3.5.2.4. Titulación de hemolisina

En una serie de tubos se mezclaron 0,4 ml de buffer veronal con 0,4 ml de complemento diluido según los resultados de la titulación anterior. Inmediatamente, se agregó a cada tubo 0,2 ml de una suspensión compuesta de partes iguales de GRC al 2,8% y hemolisina en distintas concentraciones, incubando la preparación 1 hora a 37°C. Se adoptó como dilución de trabajo aquella que producía el 50% de hemólisis según la escala.

#### 3.5.2.5. Preparación de células sensibilizadas

A un volumen de la dilución óptima de hemolisina se agregó igual cantidad de GRC al 2,8%. Previo a su uso, la mezcla hemolítica así preparada se incubó 15 minutos a 25°C.

#### 3.5.2.6. Titulación del antígeno

Para la titulación del Ag fijador de complemento se utilizó un suero inmune de origen humano previamente titulado por la misma técnica. Se realizaron diluciones en base dos desde 1/8 hasta 1/512 del Ag en buffer veronal. El suero humano se inactivó a 56°C durante 30 minutos y diluyó 1:4 en el buffer. Las diluciones crecientes al medio (volumen final 0,025 ml), se realizaron con ayuda de microdiluidores (Microtiter) en policubetas plásticas.

Se agregó a cada dilución de suero una gota (0,025 ml) de cada una de las diluciones del Ag.

Las policubetas se agitaron 15 minutos a temperatura ambiente y a cada orificio se le agregó dos gotas de complemento previamente titulado. Posteriormente, fueron selladas continuando la incubación durante 24 hs a 4°C. Concluida la incubación se agregó a cada orificio una gota de la mezcla hemolítica incubando luego las placas a 37°C durante media hora. Las policubetas fueron luego centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpm para su lectura. Se consideró como título del Ag la mayor dilución que produjo el 50% de hemólisis.

#### 3.5.2.7. Reacción de fijación de complemento

Las muestras de suero a titular fueron diluídas al me-

dio en buffer veronal e inactivadas durante 30 minutos a 60°C. La reacción se realizó en policubetas plásticas en las que, a cada uno de los orificios, se les agregó 0,2 ml de buffer veronal realizando las diluciones correspondientes de los sueros por duplicado.

A una de las series de diluciones al medio de cada suero entre 1/4 y 1/512 se le añadió igual volumen de Ag y a la otra, una gota de buffer veronal, a los efectos de determinar la posible actividad anticomplementaria de los sueros. Después del agregado del Ag o del buffer según corresponda, las placas se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, y luego se les adicionó a cada orificio dos gotas de complemento previamente titulado. Las policubetas fueron selladas y almacenadas a 4°C hasta el día siguiente.

Después de añadirle a cada orificio una gota de la mezcla hemolítica, las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos y luego se centrifugaron 5 minutos a 1000 rpm para facilitar la lectura.

En cada policubeta se efectuaron además controles de Ag, de complemento y de la mezcla hemolítica.

### 3.5.3. Prueba de Inmunofluorescencia

Para la detección de anticuerpos específicos en suero

se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), empleando como sustrato células BHK-21 sembradas a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  células/ml sobre cubreobjetos en tubos Leighton, e infectadas con una multiplicidad de infección (MI) de 0,1. A las 48 hs pi los cubreobjetos fueron lavados en PBS, fijados en acetona fría durante 5 minutos y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

#### 3.5.3.1. Obtención de gammaglobulina de ratón

A un volumen de suero proveniente de ratones adultos normales se le agregó gota a gota medio volumen de sulfato de amonio saturado bajo agitación suave. El precipitado, obtenido por centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos fue resuspendido en SF a la mitad del volumen original. El suero fue precipitado por segunda vez en las mismas condiciones y dializado contra SF durante 48 hs con cambios diarios. La concentración proteica de las globulinas así obtenidas fue determinada por el método de Lowry (101).

#### 3.5.3.2. Preparación de suero de conejo antigammaglobulina de ratón

Conejos adultos fueron inoculados por vía intramuscular (im) con 2 ml conteniendo  $500 \mu\text{g}$  de gammaglobulina de ratón obtenida como fue descrito, en adyuvante completo de Freund (ACF).

Quince días después, los animales fueron reinoculados en idénticas condiciones. A las dos semanas de la última inoculación, los conejos se sangraron a blanco por punción cardíaca. El suero, titulado por el método de precipitación cuantitativa, fue fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El suero de conejo antigammaglobulina de ratón, fue precipitado con solución saturada de sulfato de amonio siguiendo la técnica descrita en el punto anterior.

#### 3.5.3.3. Preparación del conjugado fluorescente

A un recipiente conteniendo 40 ml de solución de gamma globulina de conejo antigammaglobulina de ratón al 1,2% tamponada en buffer de bicarbonato 0,5 M pH9, se le añadió 20 mg de isotiocianato de fluoresceína y la mezcla fue agitada durante 16 hs a  $4^{\circ}\text{C}$ . El conjugado se dializó contra PBS a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 8 días con cambios diarios. Completada la diálisis se eliminaron los precipitados por centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y, previo al agregado de 5 ml de solución de mertiolate 1/1000, el conjugado fluorescente se fraccionó en volúmenes de 0,5 ml y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.5.3.4. Determinación de anticuerpos fluorescentes

Los cultivos de células BHK-21 infectados, se cubrieron con 0,05 ml de distintas diluciones (1/10 a 1/640) de las mues

tras de suero a titular. Luego de incubarlos a 37°C durante 1 hora en cámara húmeda y lavados dos veces con PBS y agua destilada fueron montados en portaobjetos utilizando buffer glicerinado pH 8,3. Se consideró título del suero a la mayor dilución que presentaba como mínimo 2 células fluorescentes por campo 25x.

#### 3.5.4. Cromatografía

Para determinar la clase de inmunoglobulina responsable de la actividad neutralizante, fijadora de complemento o fluorescente, se empleó la técnica de separación de proteínas por filtración en geles.

Muestras de 1 ml de suero se sembraron en una columna cromatográfica de 2,5 cm x 95 cm conteniendo 500 ml de Sephadex G-200 (Pharmacia Fine, Chemicals, Uppsala, Suecia) en PBS. Antes de comenzar los experimentos se controló la homogeneidad del lecho cromatográfico corriendo 1 ml de Blue Dextran (Pharmacia) a una concentración de 2 mg/ml.

A los efectos de determinar el peso molecular, cada columna fue calibrada por medio de una serie de estándares proteicos (Gel Filtration Calibration Kits HWM y LMW Pharmacia Suecia).

Las proteínas usadas fueron Tiroglobulina (PM 669.000), Catalasa (PM 232.000), Aldolasa (PM 158.000), Albúmina Sérica Bo

vina (PM 67.000), Ovoalbúmina (PM 43.000), Quemotripsinógeno A (PM 25.000) y Ribonucleasa A (PM 13.700).

El suero utilizado en la siembra fue obtenido de ratones Balb/c de 45 días de vida infectados ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ que se sangraron el día 15 pi. El material se eluyó con PBS a un ritmo de 0,3 ml/minuto, recogiendo 60 fracciones de 6 ml cada una. Luego de medir la D.O. a 280 nm, se determinó, en aquellas fracciones de D.O. 0,3 el título de anticuerpos neutralizantes (Ac Nt), anticuerpos fijadores de complemento (Ac Fc) y anticuerpos fluorescentes (Ac Fl) por las técnicas ya descritas.

### 3.6. INMUNOSUPRESION

La droga utilizada para valorar el efecto de la inmunosupresión sobre la infección viral en el ratón adulto, fue la ciclofosfamida (Cy) (Endoxán-Asta), cedida por Laboratorios Labinca, Buenos Aires. Previo a su empleo, la droga fue diluída a la concentración adecuada en agua destilada y utilizada, en todos los casos, antes de transcurridas 2 hs de su preparación.

Las concentraciones de Cy empleadas oscilaron entre 50 y 400 mg/kg de peso y se administraron en dosis únicas o fraccionadas a distintos tiempos en relación al Ag empleado (GRC

6 VJ) según las necesidades experimentales.

La vía de inoculación empleada, en todos los casos, fue la intraperitoneal (ip).

### 3.7. CARACTERIZACION DE POBLACIONES CELULARES ESPLÉNICAS

Para la cuantificación y caracterización de las poblaciones linfoides, se emplearon técnicas de selección negativa e inmunomarcación de linfocitos T, empleando suero anti-theta, y/o de linfocitos B utilizando sueros anti-Ig. Para su realización fue necesario contar con los reactivos que se enumeran a continuación.

#### 3.7.1. Suero anti-theta

Para su preparación se siguió la técnica de Golub (102).

Conejos adultos recibieron por vía subcutánea (sc) dos inoculaciones separadas por un intervalo de 15 días de macerado al 10% de cerebro proveniente de ratones Balb/c adultos normales, con el agregado de adyuvante completo de Freund. Los conejos fueron sangrados a blanco a los 7 días de la última inoculación.

El suero así obtenido, previamente descomplementado, fue adsorbido con glóbulos rojos de ratón Balb/c en una relación



2:1 incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, el sobrenadante fue también adsorbido con 100 mg de polvo de hígado incubándolo durante una noche con agitación continua a 4°C. El sobrenadante logrado por centrifugación, fue fraccionado en volúmenes de 5 ml y almacenado a -20°C.

El polvo de hígado empleado en la adsorción, fue obtenido a partir de hígado proveniente de 25 ratones Balb/c, los que fueron homogeneizados en SF adicionándoles luego 400 ml de acetona. El residuo así obtenido fue lavado por el agregado de acetona bajo agitación y posteriormente secado sobre papel de filtro en estufa a 37°C durante 1 hora.

Para la titulación del suero anti-theta se utilizó la técnica de citotoxicidad descripta por Reif (103).

Brevemente, consistió en preparar alícuotas (0,05 ml) de una suspensión de  $10^6$  timocitos de ratón adulto/ml, a los que se les agregó partes iguales de distintas diluciones desde 1/8 hasta 1/1024 del suero anti-theta a titular y 0,1 ml de complemento. Los tubos fueron incubados 1 hora a 37°C en baño María y la citotoxicidad obtenida fue valorada por el método de exclusión con azul trypan.

### 3.7.2. Suero de cabra anti-gammaglobulina de conejo

Fue preparado empleando una cabra adulta la que recibió por vía im dos inoculaciones separadas por 15 días de interva-

lo, de una suspensión conteniendo 500  $\mu$ g cada una de gammaglobulina de conejo en ACF. La gammaglobulina fue obtenida por precipitación con sulfato de amonio como ya ha sido descrito en el punto 3.5.3.1. A los 10 días de la última inoculación se reinoculó por vía endovenosa (ev) con 1 mg de gammaglobulina y por la misma vía 10 mg 24 hs más tarde. A los 15 días de la última inoculación, el animal fue sangrado por la vena yugular y el suero obtenido fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La purificación del suero de cabra anti-gammaglobulina de conejo y la preparación del conjugado fluorescente se realizó en las mismas condiciones experimentales que ya fueron descritas en el punto 3.5.3.3.

La gammaglobulina de cabra anticonejo marcada, fue titulada por la técnica de IFI (3.7.4.). Para ello a tubos conteniendo  $10^7$  células de bazo provenientes de ratones Balb/c adultos, se les agregó suero de conejo antigammaglobulina de ratón. Los tubos fueron incubados a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y luego de lavar las células tres veces por centrifugación, se les adicionó diferentes diluciones de gammaglobulina de cabra marcada con isotiocianato de fluoresceína (desde 1/10 hasta 1/80).

Se eligió como dilución de trabajo aquella en la que no se observaba fluorescencia inespecífica y las células se teñían nítidamente.

### 3.7.3. Suero de conejo anti-gammaglobulina de ratón

Fue preparado siguiendo los pasos que se describen en el punto 3.5.3.2.

### 3.7.4. Cuantificación de las poblaciones celulares esplénicas por inmunofluorescencia indirecta

Para obtener suspensiones celulares aisladas, bazos provenientes de distintos lotes de ratones Balb/c fueron rallados sobre malla metálica contenidas en cajas de Petri, a las que se hahía agregado PBS Dulbecco adicionado con 2% de suero fetal bovino inactivado. Las suspensiones celulares así obtenidas fueron filtradas por algodón para eliminar los detritus remanentes. Las células aisladas fueron sometidas a "shock" hipotónico para lisar los glóbulos rojos durante 20 minutos a 20°C con una mezcla de Tris-NH<sub>4</sub>Cl y luego del agregado de 10 ml de PBS para restaurar la isotonicidad fueron centrifugadas a 1.350 rpm. Luego de lavadas por centrifugación tres veces con Dulbecco, las células se resuspendieron en sacarosa y sorbitol y se filtraron por algoñón flojo dentro de pipetas Pasteur siliconadas para remover las células muertas.

Alícuotas de  $10^7$  linfocitos viables en medio conteniendo azida sódica (N<sub>3</sub>Na) a una concentración final de 20 mM, fueron incubadas 30 minutos a 4°C con suero de conejo anti-Ig de ratón o

suero anti-theta para identificar LB ó LT respectivamente.

Luego de la incubación las células fueron lavadas por centrifugación y se les agregó 0,1 ml de suero de cabra anti-gammaglobulina de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína, incubando la suspensión celular durante 30 minutos a 4°C. Luego de tres lavados para eliminar el exceso del conjugado, el sedimento se resuspendió en buffer glicerinado pH 8,3 y las células se observaron por epifluorescencia (Carl Zeiss Mod. 46 63 00 9901) con objetivo 100 x.

El porcentaje de células positivas se calculó en base a recuentos hechos sobre, por lo menos, 300 células.

### 3.8. CUANTIFICACION DE LA REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA HACIA GRC POR EL METODO DEL "SWELLING TEST" (104)

Los ratones fueron sensibilizados por vía ip ó ev, de acuerdo a las necesidades experimentales, ya sea con  $10^9$ ,  $10^8$  ó  $10^6$  GRC en SF contenidos en 0,2 ml (Dosis sensibilizante, Ds). En diferentes tiempos de la Ds, la reacción de HR fue desencadenada (Dd) inoculando los animales en la almohadilla plantar con  $10^8$  GRC contenidos en 0,05 ml.

La reacción fue cuantificada comparando el espesor de la almohadilla plantar registrado en la lectura previa a la Dd

(tiempo 0) con la obtenida a las 24 hs de la Dd. Para la lectura se utilizó un calibre manual (Oditest<sup>(R)</sup>, H.C.Koplin, Schuterchn-Hessen, Alemania Federal) graduado en 0,05 mm.

La fórmula utilizada para calcular el porcentaje de aumento fue la siguiente:

$$\% \text{ de aumento} = \frac{\text{Medida de 24 hs} \times 100}{\text{Medida de tiempo 0}} - 100$$

### 3.9. DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS FORMADORAS DE ANTI-CUERPOS HACIA GRC

El número de células formadoras de IgM hacia GRC (placas directas), presente en los bazos de los animales, fue determinado individualmente a distintos tiempos luego de la inmunización utilizando la técnica de Cunningham (105).

Los ratones se sacrificaron con éter y los bazos fueron rallados individualmente sobre malla de metal en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo a pH 7,2 (MEM) con el agregado de Hepes como estabilizador. Los glóbulos rojos fueron lisados como se describió en el punto 3.7.4.

Las células esplénicas se contaron en cámaras de Neubauer y ajustaron a una concentración de  $4,2 \times 10^6$  células viables/ml, resuspendiéndolas en medio conteniendo gelatina al 0,5%. La via-

bilidad se determinó por exclusión con azul trypán.

Cincuenta  $\mu$ l de una mezcla compuesta por 150  $\mu$ l de la suspensión celular, 20  $\mu$ l de GRC al 20% y 40  $\mu$ l de suero fresco de cobayo como fuente de complemento, fueron sembrados en cámaras construídas con portaobjetos (106), de manera de formar una fina monocapa celular. Las cámaras se sellaron por inmersión en parafina fundida y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Luego del tiempo de incubación las placas de hemólisis producidas por las células formadoras de anticuerpos (CFA) se cuantificaron bajo lupa y los valores obtenidos se expresaron como CFA por  $10^7$  células esplénicas.

### 3.10. ENSAYOS DE TRANSFERENCIA PASIVA

#### 3.10.1. Humoral

Para la preparación de líquido ascítico inmune (LAI) a ser utilizado en estos ensayos, se emplearon ratones Balb/c de 45 días de vida, los que recibieron tres inoculaciones por vía ip de  $10^5$  DL<sub>50</sub> de VJ, cepa XJ, separadas cada una de ellas por dos semanas de intervalo. A los 7 días de la última inoculación los animales recibieron 0,5 ml de tumor ascítico (Sarcoma 180) por vía ip. Los ratones se sacrificaron entre los 7-10 días después de la última inoculación de virus y el LAI producido se

extrajo por punción abdominal.

El título de Ac Nt del LAI fue determinado en células Vero, empleando la técnica descrita en el punto 3.5.1.

Como control, se utilizó en los ensayos líquido ascítico normal (LAN) obtenido 7 días después de la inoculación a animales normales del tumor ascítico en las mismas condiciones descritas.

Las gammaglobulinas contenidas en el LAI se precipitaron dos veces sucesivas con solución saturada de sulfato de amonio como se describe en el punto 3.5.3.1. eliminándose las sales por cromatografía en Sephadex G-25 (107).

El título de anticuerpos neutralizantes obtenido luego de la precipitación fue 1/1280.

### 3.10.2. Celular

Para los ensayos de transferencia pasiva de células, ratones adultos dadores fueron sensibilizados ya sea con 5 inoculaciones semanales de  $5 \times 10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ip, o con una sola inoculación con la misma dosis de virus pero por vía ic.

En el primer caso, los animales fueron sacrificados 9 días después de la última inoculación de virus y en el segundo a los 7 días pi, preparándose suspensiones de células esplénicas aisladas como fue descrito en el punto 3.7.4.

De acuerdo a las necesidades experimentales, cuando se requirió una población celular libre de linfocitos T, una parte de las células fue tratada con suero anti-theta según Tigelaar y Asofsky (108). Para ello, se procedió de la siguiente manera:  $300 \times 10^6$  células viables esplénicas (3.7.4.), fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora con 1 ml de suero anti-theta y con 2 ml de suero fresco de cobayo como fuente de complemento. Luego, las células se lavaron por centrifugación tres veces en MEM pH 7,2 y fueron resuspendidas en el mismo medio a la concentración deseada. A cada animal receptor se le inoculó, por vía ev, un volumen de 0,2 ml conteniendo un número de células equivalentes a  $80 \times 10^6$  de la suspensión original sin tratar. En todos los casos la potencia del suero anti-theta fue evaluada por citotoxicidad (3.7.1.) y el grado de selección negativa por IFI (3.7.4.)

### 3.11. RESPUESTA CELULAR AL VIRUS

#### 3.11.1. Ensayos de citotoxicidad por técnica de liberación de $^{51}\text{Cr}$

Para determinar si la infección viral generaba linfocitos T citotóxicos (Tc) se utilizó esta técnica con la que, en presencia de linfocitos sensibilizados, es posible obtener una estimación de la lisis celular del sustrato marcado en función



de la cantidad de isótopo liberado.

Se utilizaron ratones de la cepa endocriada C3H, infectados por vía ip con  $5 \times 10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ. Los bazos fueron cosechados a diferentes tiempos pi, colocados en placas de Petri conteniendo 2 ml de Hanks frío y rallados a través de mallas de acero inoxidable. Después de sedimentados los detritus, las células fueron lavadas con medio 199 suplementado con 20% de suero de ternera y ajustadas a una concentración de  $1,8-2,0 \times 10^8$  células viables/ml. La viabilidad fue determinada por exclusión con azul trypan y osciló entre 80-93%.

El ensayo citolítico empleado, fue una combinación de los métodos descritos por varios autores (84) (109): monocapas de células L929, desarrolladas en tubos Leighton ( $10^6$  células/tubo), se usaron como sustrato. Estas células fueron empleadas por ser histocompatibles con la cepa de ratón empleada en este ensayo. Las células fueron infectadas con una MI=1 e incubadas a 37°C durante 48 hs. Este período fue elegido en base a experimentos previos que mostraron que más del 80% de las células así infectadas presentaban fluorescencia específica luego de ese lapso de incubación.

El día del ensayo, a cada uno de los cultivos infectados y sus controles, se les agregó  $10 \mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  (como cromato de sodio) provisto por la Comisión Nacional de Energía Atómica. Las células se marcaron con el isótopo radioactivo durante una

hora a 37°C y luego se lavaron seis veces para eliminar el  $^{51}\text{Cr}$  no incorporado. Los cultivos fueron cubiertos con 1 ml de las diferentes suspensiones de células esplénicas y posteriormente incubados 18-20 hs a 37°C. Se ensayaron diferentes relaciones entre el número de células del sustrato y esplenocitos. Los datos que se presentan corresponden a la relación 1:40. Después de centrifugar a 250 g durante 10 minutos, alícuotas de 0,5 ml del sobrenadante de cada tubo se tomaron para cuantificar la liberación del isótopo radioactivo.

El índice citotóxico (IC) fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{IC} = 100 \times \frac{\text{cuentas liberadas en el experimento} - \text{liberación espontánea}}{\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}}$$

- Cuentas liberadas en el experimento corresponden al cromo liberado a partir del sustrato marcado (células L929) en presencia de linfocitos Tc.
- Liberación espontánea corresponde al número de cuentas liberadas por el sustrato al medio de cultivo, sin el agregado de células.
- Liberación máxima se refiere a la cantidad de  $^{51}\text{Cr}$  liberado luego de someter al sustrato a tres ciclos rápidos de congelación y descongelación.

Las lecturas se realizaron en un contador de centelleo

sólido marca Alfanuclear, modelo E.M.

### 3.11.2. "Swelling test"

Para determinar la presencia de linfocitos efectores de la reacción de HR al virus, ratones de las cepas endocriadas C3H y Balb/c fueron sensibilizados con una dosis de  $10^3$  DL<sub>50</sub> de virus Junín por vía ic ó ip.

En todos los casos los animales fueron desencadenados en la almohadilla plantar 6 ó 9 días después de la Ds. Como Dd se inoculó a los diferentes grupos experimentales 20 ul conteniendo alternativamente  $10^6$  DL<sub>50</sub> de stock de virus (cerebro de ratón lactante) ó  $2,5 \times 10^5$  células L929 infectadas enteras o rotas por tres ciclos de congelación y descongelación.

Como controles, se emplearon macerado al 10% de cerebro de ratón normal o células L929 normales enteras o rotas respectivamente.

Las células L929 utilizadas para la descarga provenían de cultivos celulares en monocapas desarrollados en botellas, e infectadas con una MI=1 de VJ, 48 hs antes de su uso. Las células utilizadas como control sin infectar fueron procesadas de la misma forma que las anteriores excepto que se añadió en lugar del virus igual cantidad de medio 199.

El período de 48 hs pi fue seleccionado debido a que, por ensayos de IFI se había determinado que más del 80% de la

monocapa presentaba Ag viral luego de este lapso.

En todos los casos la cuantificación de la reacción se realizó a las 24 hs de la Dd, de manera similar a la descrita en el punto 3.8.

### 3.12. ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Para realizar los estudios anatomopatológicos en aquellas experiencias que así lo requerían, muestras de cerebro fueron fijadas en formol al 10% en solución reguladora de fosfatos pH 7,4 e incluidas posteriormente en parafina.

De cada una de las muestras se hicieron cortes de 6-7  $\mu$ m de espesor, las que se tiñeron con técnicas habituales de hematoxilina-eosina.

### 3.13. ANALISIS ESTADISTICO

La significancia estadística de los datos obtenidos en los distintos experimentos fue determinada de acuerdo a la prueba "t" de Student, la prueba ji-cuadrado o la prueba de igualdad de dos porcentajes, según corresponda.

Un valor  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. CARACTERISTICAS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DEL RATON ADULTO CON VJ

Los ensayos que se detallan a continuación estuvieron des  
tinados a determinar una serie de parámetros virológicos e inmu-  
nológicos que la infección con VJ producía en el ratón adulto.

En distintos lotes de animales se estudió:

- Morbimortalidad, que fue registrada hasta los 35 días pi.
- Contenido de virus en cerebro, por titulación en células Vero de muestras obtenidas los días 5,8,10,15 y 20 pi. La disemina-  
ción hacia sangre y órganos, bazo, hígado, páncreas, riñón y pul-  
món, se realizó por técnicas de co-cultivo en muestras tomadas  
diariamente desde el día 1 al día 7 pi y los días 10 y 15.
- Respuesta humoral específica, valorada por la presencia de Ac Nt,  
y Ac Fl y posterior determinación de la clase de inmunoglobu-  
linas a la que pertenecían cada uno de ellos.

Para realizar las experiencias, muestras de sangre prove-  
nientes de animales infectados fueron obtenidas a los 2,5,8,  
12,15,20,25 y 30 días pi.

- Cinética de aparición de los linfocitos Tc en células espléni-  
cas en diferentes tiempos pi.

- Respuesta de HR hacia el virus valorada por la técnica del "swelling test".

Para la realización de los tres primeros estudios, se emplearon ratones Balb/c, en el cuarto se utilizaron animales de la cepa C3H y en el último ambas cepas.

En todos los casos los ratones fueron adultos de 45 días de vida infectados ya sea con  $10^3$  ó  $10^5$  DL<sub>50</sub> de VJ por vías ip ó ic, de acuerdo a las necesidades experimentales.

#### 4.1.1. Morbimortalidad

En un trabajo anterior (73) se había determinado que la mortalidad del ratón adulto cepa CFW, infectado con  $10^3$  DL<sub>50</sub> por vía ic a los 30 días de vida era del 7,0%. Este porcentaje no difirió del observado en nuestro estudio empleando ratones Balb/c de 45 días de vida, ya que en el total de las experiencias realizadas, la mortalidad promedio no superó el 8%. La mortalidad se registró entre los 14 y 17 días pi, sin que los animales manifestaran signos clínicos de enfermedad.

#### 4.1.2. Contenido de virus en cerebro y órganos

El título de virus en el cerebro de los animales Balb/c infectados con la misma dosis y por la misma vía que los anteriores se valoró en cultivo de células Vero, por la técnica de formación de placas descrita en el punto 3.4.1.

Tabla I: Distribución de virus en órganos y sangre de ratones Balb/c de 45 días de vida con VJ detectado por cocultivo.

Muestras provenientes de	Días pi								
	1	2	3	4	5	6	7	10	15
Cerebro	<sup>(a)</sup> -/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
Bazo	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Hígado	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Páncreas	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Riñón	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Pulmón	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Sangre	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

(a) Detección de virus en sobrenadante por infectividad para ratón lactante/ Detección de virus en monocapas por inmunomarcación (PAP).

Cuando se utilizó esta técnica no se detectó replicación viral en ninguna de las muestras ensayadas.

La presencia de virus se determinó también en cerebro y en órganos por inmunomarcación de la monocapa de células permisivas y por titulación de los sobrenadantes de co-cultivo como se describió en el punto 3.4.2. de Materiales y Métodos.

La Tabla I muestra los resultados obtenidos mediante el uso de esta técnica. Como puede observarse, fue posible detectar virus en cerebro en todos los materiales procesados a partir del día 2 y hasta el día 5 pi inclusive. La presencia de virus en bazo fue demostrada en muestras correspondientes a los días 3 y 4 pi. Además, los animales presentaron una fugaz viremia los días 2 y 4 pi. En la misma Tabla se observa que, cuando se procesaron los sobrenadantes de los co-cultivos para determinar infectividad para ratones lactantes, los resultados obtenidos fueron totalmente coincidentes con los de la inmunomarcación.

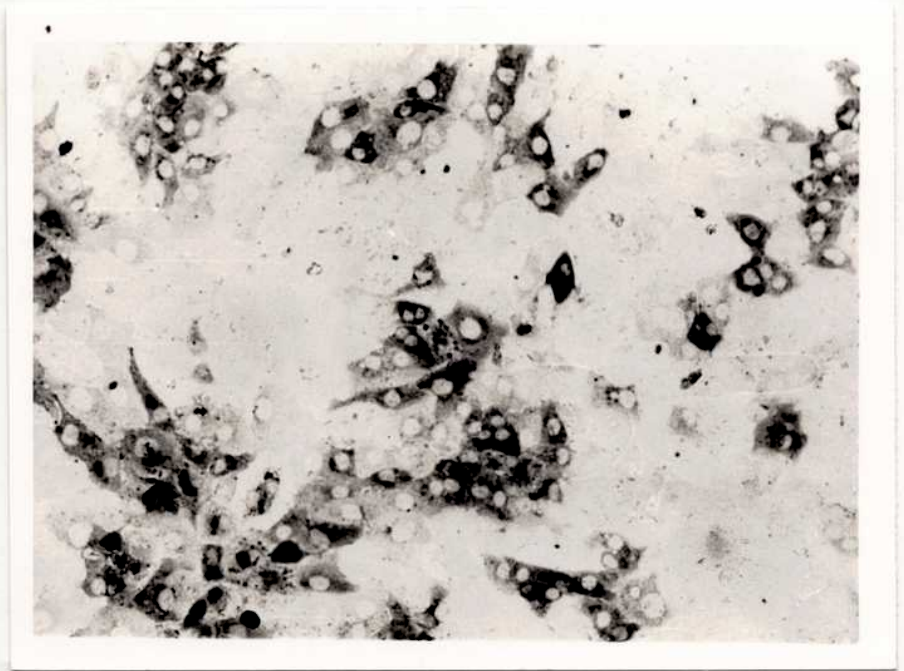
En las Figuras 3, 4 y 5 se muestra la intensa inmunomarcación de Ag Junín presente en los co-cultivos de células Vero con células provenientes de cerebro, sangre y bazo, respectivamente.

#### 4.1.3. Respuesta humoral específica

En lo que se refiere a la respuesta humoral que desarrollaron los animales infectados en las mismas condiciones ya descrip-



Figura 3



Co-cultivo de células Vero con cerebro de ratón adulto infectado ic con VJ. Se observa una intensa inmunomarcación de Ag Junín. Método PAP. 144 x.

Figura 4



Co-cultivo de células Vero con sangre de ratón  
adulto infectado ic con VJ. Acentuada concentración  
de Ag Junín en células Vero. Método PAP. 144 x.

Figura 5



Co-cultivo de células Vero con células de bazo de ratón adulto infectado ic con VJ. Se observan células alargadas (Vero) y redondeadas (esplénicas) con elevada concentración de Ag Junín. Células negativas de igual origen en el fondo. Método PAP. 144 x.

tas, (Figura 6) puede observarse que los Ac Nt y Ac Fc fueron detectados en niveles significativos a partir de los 8 días de la infección (1/10 y 1/32 respectivamente). En los casos de los Ac Nt, los títulos aumentaron progresivamente hasta alcanzar el pico máximo (1/160) a los 20 días pi, y disminuyeron luego a valores de 1/40 a los 30 días, momento de la última toma de muestras.

Con respecto a los Ac Fc, a partir de su aparición, se mantuvieron en valores constantes entre 1/32 y 1/64 hasta el final de la experiencia.

Los Ac Fl se detectaron en niveles de 1/20 a partir de los 12 días pi, aumentaron su título hasta los 20 días (1/80), registrándose luego una brusca caída 5 días más tarde en la muestra obtenida en el día 25 pi, hasta ser indetectable el día 30 pi.

Cuando los sueros positivos fueron filtrados por Sephadex G-200 para determinar el tipo de inmunoglobulina responsable de cada una de las actividades mencionadas, se demostró que, si bien los Ac Nt predominaban en las fracciones correspondientes a la IgG, también fue posible detectar actividad neutralizante en una de las fracciones de alto peso molecular.

En lo que se refiere a los Ac Fl, éstos fueron hallados exclusivamente en las fracciones de peso molecular bajo, en tanto

Figura 6

Título de anticuerpos neutralizantes, fluorescentes y factores de complemento en ratones Balb/c de 45 días inoculados con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ.

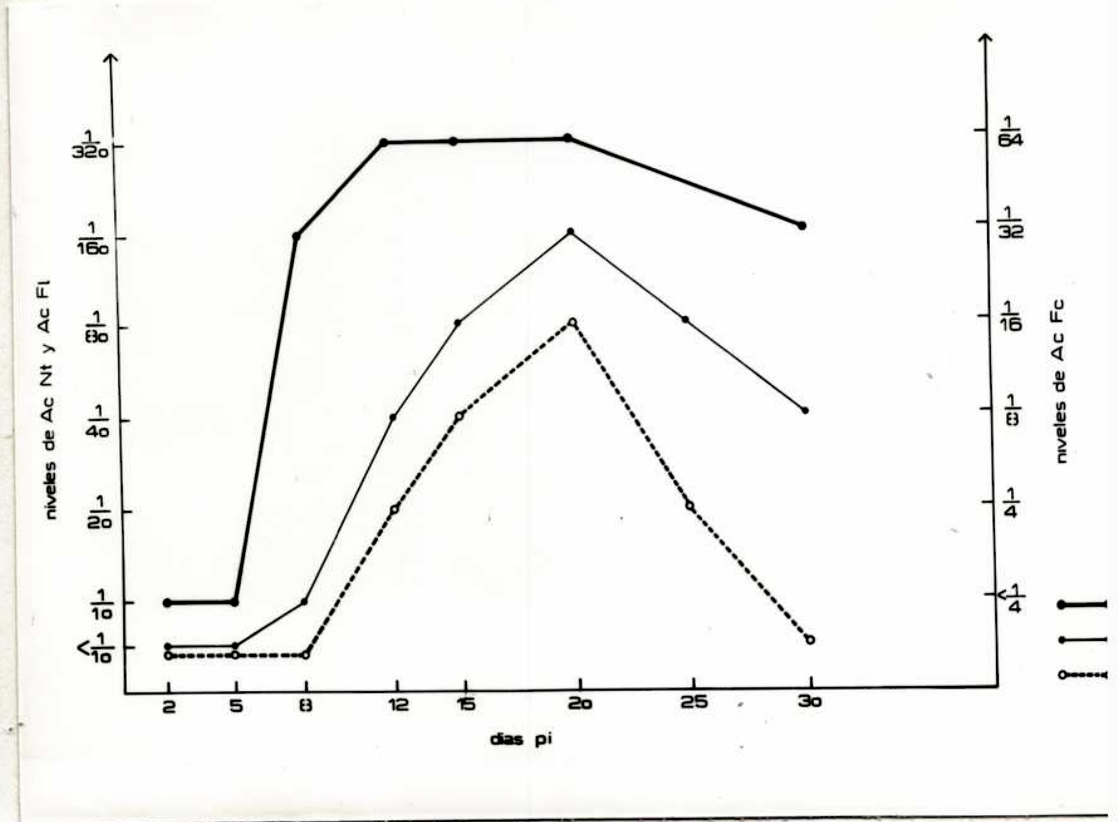
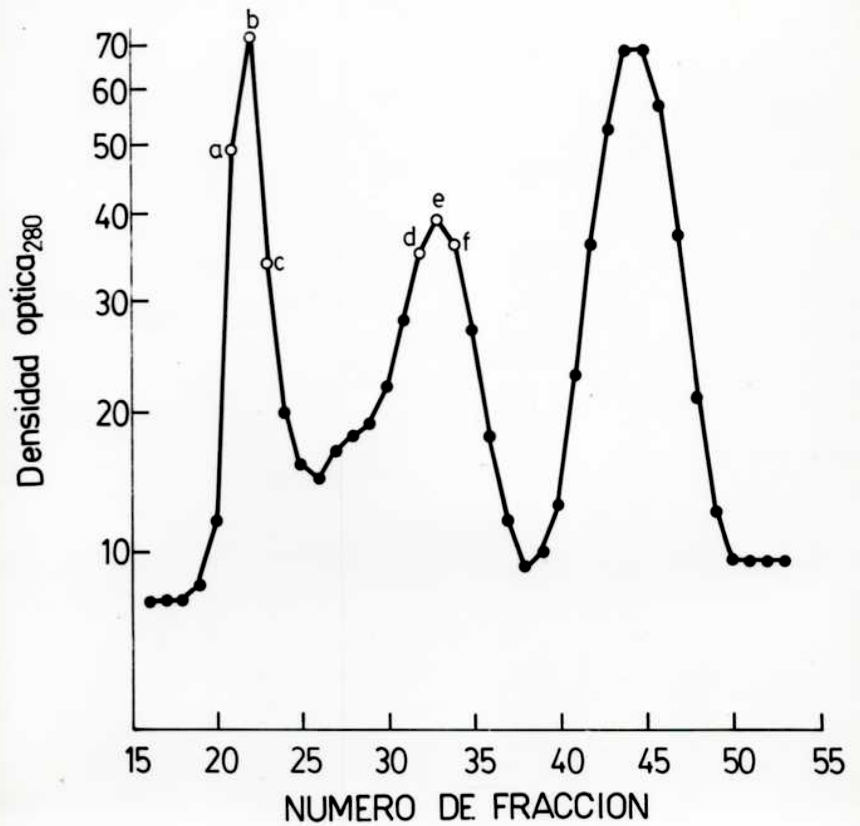


Figura 7

Separación por columna de Sephadex G-200 de suero de ratones Balb/c adultos infectados ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub>.



	a	b	c	d	e	f
AcFc	1/64	1/28	<1/4	<1/4	<1/4	<1/4
AcNt	<1/10	<1/10	1/40	1/20	1/80	1/40
AcFl	<1/10	<1/10	<1/10	<1/10	1/40	1/10

que la actividad fijadora de complemento se encontró asociada sólo a las fracciones correspondientes a la IgM. Los resultados se muestran en la Figura 7.

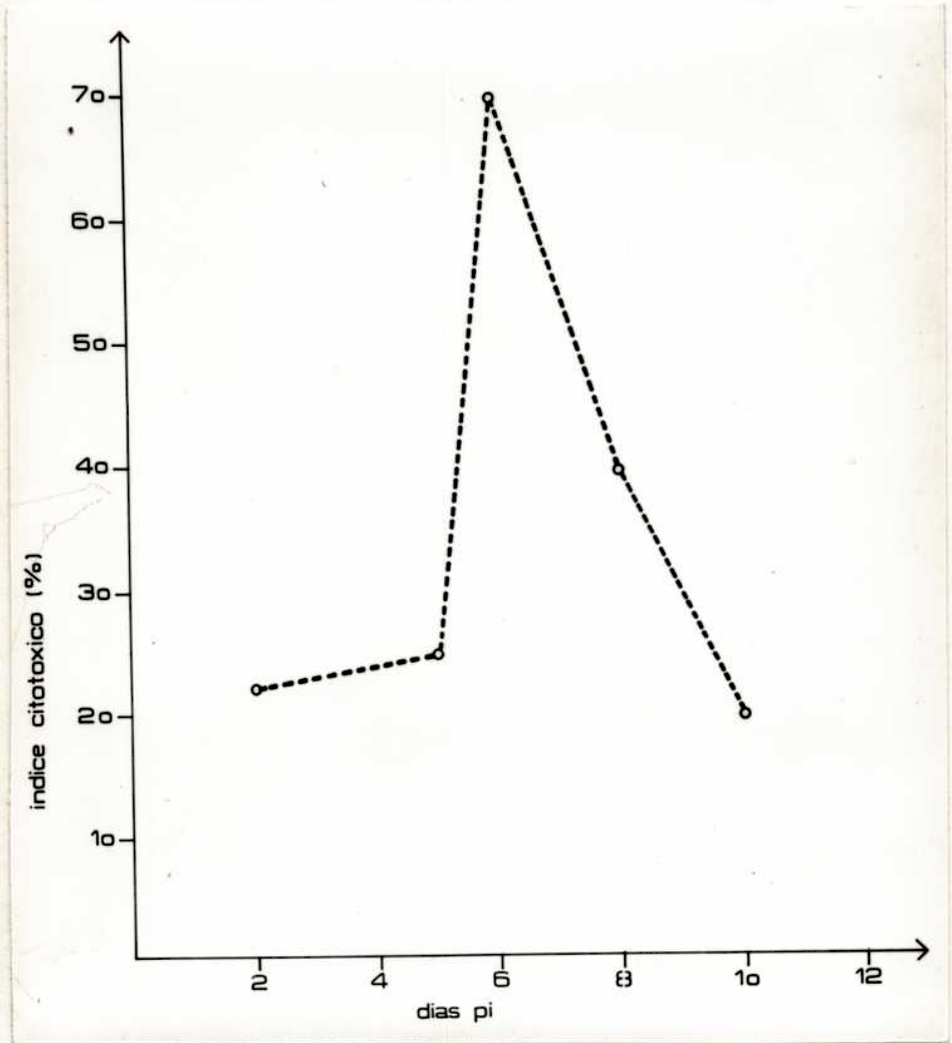
#### 4.1.4. Cinética de aparición de los linfocitos Tc en células esplénicas

Como ya se señaló en el punto 3.11.1. de Materiales y Métodos, el ensayo para la detección de linfocitos Tc, generados como consecuencia de la infección viral con  $10^3$  DL<sub>50</sub> por vía ic, fue realizado con células esplénicas provenientes de ratones C3H. Las muestras se obtuvieron a los 2, 5, 6, 8 y 10 días luego de la infección y la actividad citotóxica fue determinada en cultivos de células L929 infectadas con VJ. Esta línea celular fue seleccionada por ser genéticamente histocompatible con las células esplénicas provenientes de los ratones de la cepa C3H.

Los valores que se grafican en la Figura 8 representan el promedio de tres experiencias separadas. Puede observarse que muy tempranamente, a los 2 días pi, pudo detectarse una significativa actividad citotóxica en las células esplénicas, ya que se registró un índice citotóxico de 23,7%. Este valor fue similar al del día 5 pi. El índice aumentó luego rápidamente hasta alcanzar su pico máximo el 6° día pi, con un porcentaje de liberación del isótopo de 60,9% para disminuir a valores de 20% en el día

Figura 8

Cinética de aparición de linfocitos T citotóxicos en células espl  
de ratones C3H adultos infectados ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ.



-Las células esplénicas fueron colocadas en una relación 40 respecto a las células blanco.

-Cada punto representa el valor promedio de 6-9 animales.

-Todos los valores fueron significativos con respecto a los les utilizando el test de Student.

Días 2,6,8 y 10 pi p 0,001

Días 5 pi 0,01 p 0,001



10 pi. Todos los valores del ensayo de citotoxicidad presentados en la Figura 8, mostraron ser estadísticamente significativos con respecto a los controles utilizando el test de Student.

#### 4.1.5. Respuesta de HR valorada por el "swelling test"

Como fue descrito en Materiales y Métodos, se intentaron una serie de modelos experimentales tendientes a determinar si el ratón adulto infectado con VJ desarrollaba un mecanismo de hipersensibilidad mediada por células.

Las variables en sucesivos ensayos se introdujeron en, la cepa de ratón empleada (Balb/c o C3H), en la vía de inoculación del virus (ic ó ip) y en el sustrato viral empleado para desencadenar la reacción (cerebro de ratón lactante o células L929 enteras o rotas).

Distintos grupos de ratones adultos Balb/c infectados por vía ic fueron desencadenados con  $10^6$  DL<sub>50</sub> de un stock de virus proveniente de cerebro de ratón lactante.

Los resultados obtenidos a los 6 ó 9 días de la Ds y en los controles se muestran en la Tabla II.

En base a estos resultados que no mostraron una reacción de HR hacia el virus que pudiese considerarse significativa se decidió ensayar otro modelo, que permitiese proveer de una masa antigénica mayor con la cual realizar la Dd.

Tabla II: Respuesta de hipersensibilidad retardada en ratones adultos <sup>(a)</sup> valorada por el "swelling test".

Cepa	Dosis sensibilizante		Dosis desencadenante		HR b)
	Vía	Día pi	Sustrato	X ± ES <sup>(c)</sup>	
Balb/c	ic	6	CI	0,26 ± 2,16	
			CN	0,39 ± 1,22	
	ic	9	CI	1,89 ± 1,40	
			CN	1,43 ± 1,43	
C3H	ic	6	CI	4,99 ± 0,96	
			CN	1,62 ± 1,68	
	ic	9	CI	4,78 ± 2,95	
			CN	2,75 ± 2,95	
	ic	6	LI (E)	24,26 ± 1,93	
			LN	9,38 ± 1,46	
	ic	9	LI (E)	19,43 ± 2,66	
			LN	9,74 ± 7,65	
	ic	6	LI (R)	24,54 ± 3,50	
			LN (R)	8,35 ± 1,50	
	ic	9	LI (R)	30,26 ± 3,45	
			LN (R)	9,45 ± 2,05	
ip	6	LI (E)	34,43 ± 4,09		
		LN	8,22 ± 0,82		
ip	9	LI (E)	18,33 ± 6,84		
		LN	8,00 ± 1,33		

Referencias Tabla II:

a) Ratones Balb/c o C3H sensibilizados por vía ip o iv con una dosis de  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ en el día 0 (Ds).

b) Todos los valores corresponden al promedio de 8-12 animales por tiempo.

c) Prueba de Student  $p < 0,05$

CI: cerebro infectado

CN: Cerebro normal

LI (E): células L infectadas enteras

LI (R): células L infectadas rotas

LN: células normales

LN (R): células normales rotas

Para ello ratones C3H se infectaron con una dosis de virus por vía ic ó ip y se desencadenaron en los mismos tiempos descriptos anteriormente ya sea con cerebro de ratón lactante infectado o con células L929 infectadas (rotas o enteras).

Para todos los grupos experimentales descriptos se utilizaron como controles ratones sensibilizados de manera similar y desencadenados ya sea con cerebro de ratón normal o celulas L929 sin infectar enteras o rotas según correspondiera.

Como se observa también en la Tabla II los ratones C3H sensibilizados por vía ic y desencadenados con cerebro infectado, a semejanza de lo registrado en los Balb/c, no mostraron ni a los 6 ni a los 9 días post-Ds reacción de HR al virus ya que los valores no difirieron estadísticamente de sus respectivos controles.

Sin embargo cuando se utilizaron como desencadenante células histocompatibles infectadas pudo detectarse una intensa reacción de HR.

La Tabla II muestra también que si bien los valores fluctuaron entre  $18,33 \pm 6,84$  y  $34,43 \pm 4,09$  deben ser considerados altamente significativos en una reacción de HR valorada por la técnica del "swelling test", ya que el incremento con respecto a sus controles osciló entre el 50 y el 70%.

Aceptando lo anterior es decir que todos los niveles de

HR obtenidos son altos podría concluirse que, es independiente en estas condiciones experimentales, la vía que se emplee para la sensibilización, el momento y la integridad de las células usadas en la Dd. Sin embargo, cabe destacar que el máximo valor de HR obtenido fue cuando los ratones C3H se sensibilizaron por vía ip, y se desencadenaron a los 6 días con células L929 infectadas enteras.

#### 4.1.6. Acción inmunosupresora de la infección por VJ

Como fue señalado en la Introducción, los virus inducen en el huésped una gran variedad de respuestas inmunes específicas pero asimismo si la infección y replicación viral se establece en células del sistema inmunológico son capaces de provocar alteraciones funcionales que se reflejan como disminución o aumento de la reactividad hacia otros antígenos.

En el caso del VJ, como fue demostrado en el punto 4.1.2. en la infección del ratón adulto, aún cuando la replicación viral es escasa, es posible detectar virus en bazo, un órgano estrechamente comprometido en la respuesta inmune.

Experimentos previos realizados utilizando el cobayo como modelo experimental, demostraron que el VJ es capaz de deprimir la respuesta inmunológica tanto celular como humoral (110)

Se decidió entonces completar el estudio del ratón adulto

infectado si el VJ afectaba células ya sea del compartimiento humoral o celular que pudiera manifestarse por alteraciones en la respuesta hacia antígenos heterólogos. Para ello se utilizó como antígeno glóbulos rojos de carnero (GRC).

4.1.6.1. Determinación de dosis óptima de GRC para inducir CFA y HR

En una primera etapa se ensayaron diferentes dosis y vías de administración de GRC con el objeto de determinar el esquema óptimo de inmunización necesario para desencadenar la respuesta humoral o celular.

En una serie de tres experiencias sucesivas, tres grupos constituidos por 8 ratones cada uno, fueron inoculados por vía ip con  $10^6$ ,  $10^8$  ó  $10^9$  GRC en SF y otros 3, constituidos por el mismo número de animales, con iguales dosis pero por vía ev. En ambos casos la dosis de GRC estuvo contenida en 0,2 ml. A los 7 días de la inmunización 5 animales de cada uno de los grupos experimentales recibieron una Dd de  $10^8$  GRC en la almohadilla plantar para medir la reacción de HR como fue descrito en el punto 3.8. de Materiales y Métodos.

A los tres animales restantes de cada grupo que no recibieron Dd se les extrajo el bazo para cuantificar en ellos la CFA (punto 3.9.).

Tabla III: Respuesta humoral (CFA) y celular (HR) del ratón adulto hacia glóbulos rojos de carnero (GRC)

GRC		CFA/10 <sup>7</sup> células <sup>(a)</sup>	HR <sup>(b)</sup>
DOSIS	VIA	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$
10 <sup>9</sup>	ev	2.199,78 $\pm$ 119,14	7,70 $\pm$ 1,37
10 <sup>9</sup>	ip	2.104,55 $\pm$ 112,90	4,10 $\pm$ 2,03
10 <sup>8</sup>	ev	1.280,42 $\pm$ 67,85	3,96 $\pm$ 1,00
10 <sup>8</sup>	ip	3.240,20 $\pm$ 472,60	1,00 $\pm$ 0,43
10 <sup>6</sup>	ev	45,23 $\pm$ 5,25	11,23 $\pm$ 1,97
10 <sup>6</sup>	ip	36,66 $\pm$ 8,91	14,31 $\pm$ 1,70

(a) Valores obtenidos a los 7 días de la Ds. Promedio de 3 experiencias realizadas con 3 animales cada una.

(b) Medida como hinchazón de la pata luego de la Dd realizada por vía intraplantar a los 7 días de la Ds. Los valores se expresan como porcentaje de aumento entre la medida obtenida antes de la Dd y 24 hs después. Promedio de 3 experiencias realizadas con 5 animales cada una.

Los resultados mostraron que con dosis de  $10^8$  y  $10^9$  GRC, se obtiene una buena respuesta de CFA y pobre reacción de HR, en tanto que la dosis de  $10^6$  resultó ser óptima para generar HR y subóptima para la respuesta de anticuerpos.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III. En todos los casos los valores de CFA y HR fueron estadísticamente diferentes entre  $10^6$  y  $10^8$  ó  $10^9$  por la prueba de Student, no mostrando diferencias entre  $10^8$  y  $10^9$  como Ds.

Todas estas afirmaciones son válidas para las dos vías de inmunización empleadas, es decir ip y ev, por lo tanto, en los experimentos que se detallan a continuación se empleó solamente la vía ip por ser de más fácil realización.

Como fue mencionado, la Dd para poner de manifiesto la reacción de HR fue administrada a los 7 días de la estimulación antigénica con GRC. Sin embargo, para interpretar en su totalidad la respuesta interesaba conocer la cinética de aparición ya sea de las CFA y de la HR a partir de la estimulación antigénica.

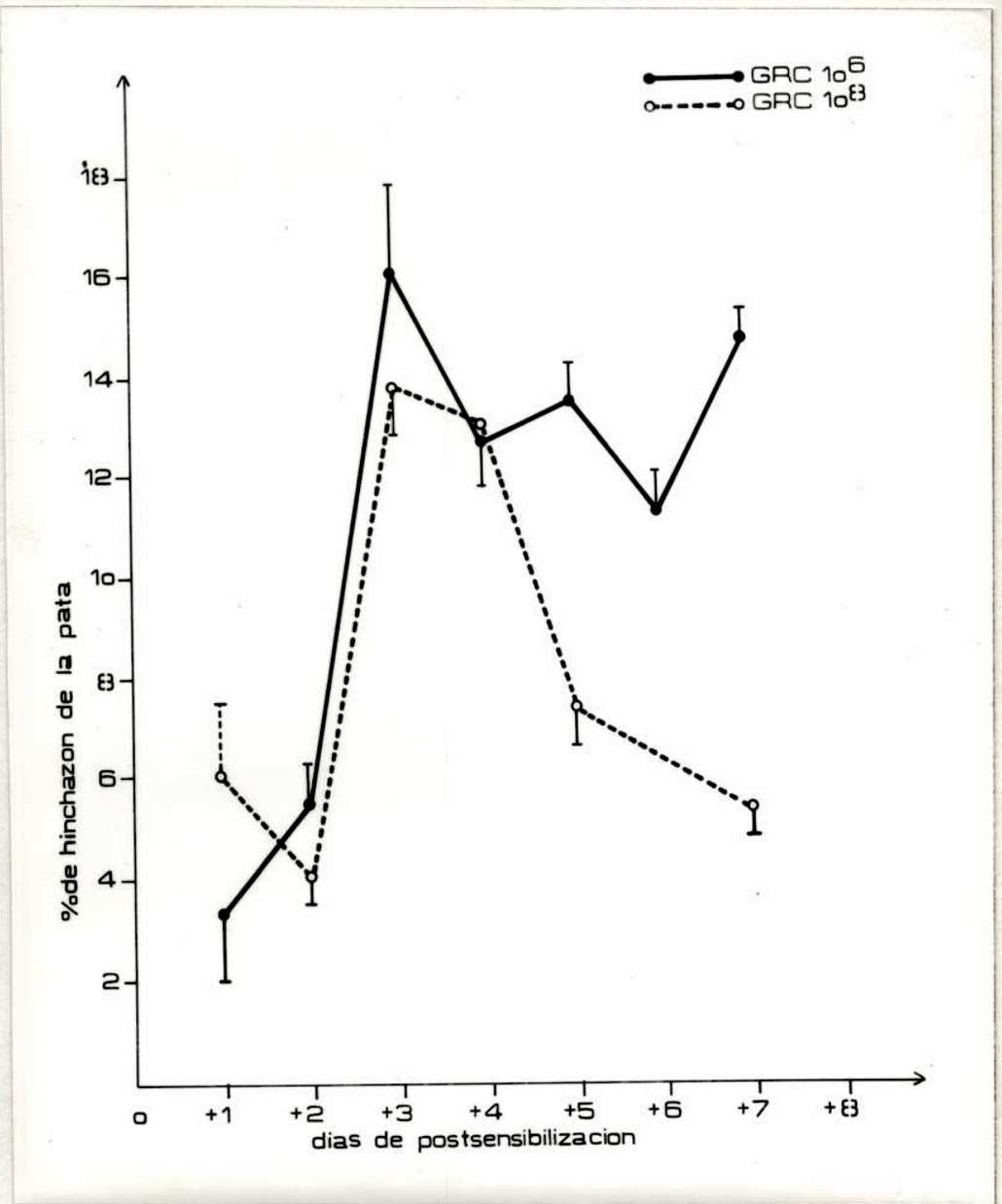
#### 4.1.6.2. Cinética de la reacción de HR

A pesar de que se había determinado que la Ds óptima de GRC para obtener respuesta de HR a los 7 días era  $10^6$  el estudio de la cinética de esta respuesta se hizo tanto con  $10^6$  como con  $10^8$  GRC. Para estudiar la reacción de HR, 112 ratones Balb/c



Figura 9

Cinética de la reacción de HR hacia GRC en ratones Balb/c adultos.



Cada valor representa la  $\bar{X} \pm ES$  de 8 animales sensibilizados con  $10^6$  ó  $10^8$  GRC y desencadenados con  $10^8$  GRC por vía intraperitoneal a diferentes tiempos de la Ds.

fueron sensibilizados con  $10^6$  ó  $10^8$  GRC por vía ip y 8 animales por tiempo fueron desencadenados diariamente en la almohadilla plantar desde el día +1 al día +7 de la Ds. Los resultados obtenidos en este ensayo se expresan en la Figura 9. De su análisis surge que tanto la Ds con  $10^8$  como con  $10^6$  GRC produce un pico máximo de reacción en el día +3 de la estimulación antigénica alcanzando valores de  $13,9 \pm 1,1$  y  $16,1 \pm 1,7\%$  respectivamente. Mientras que en los animales inoculados con  $10^6$  los niveles se mantienen entre  $11,3 \pm 0,5$  y  $14,5 \pm 0,4\%$  hasta el día +7, en los inoculados con  $10^8$  se produce una paulatina disminución en la reacción, que llega a valores finales del  $5,5 \pm 0,4\%$ .

#### 4.1.6.3. Cinética de aparición de las CFA

Para conocer la cinética de aparición de las CFA, 24 ratones Balb/c adultos fueron sensibilizados con  $10^8$  GRC por vía ip sacrificando 6 animales por tiempo, los días 4, 5, 6 y 7 después de la estimulación antigénica. La media aritmética del número de CFA esplénicas halladas en cada muestra figuran en la Tabla IV expresadas como CFA por cada  $10^7$  células de bazo.

Puede observarse que de un valor basal promedio de  $7 \pm 3$  CFA por  $10^7$  células esplénicas obtenidas en los animales sin estimulación antigénica, ya al 4° día de la Ds, se hallan valores del orden de las 2.000 CFA. Al 5° día post-estimulación se obtuvo el

Tabla IV: Cinética de aparición de las CFA hacia GRC en ratones adultos. (a)

Día del ensayo (b)	CFA/10 <sup>7</sup> células (c) $\bar{X} \pm ES$
0	7 $\pm$ 3
+ 4	2.090 $\pm$ 374
+ 5	11.226 $\pm$ 374
+ 6	2.831 $\pm$ 238
+ 7	3.053 $\pm$ 271

(a) Animales Balb/c de 45 días de edad, inculados con 10<sup>8</sup> GRC por vía ip

(b) Considerando día 0 el de la Ds.

(c)  $\bar{X} \pm ES$  de 6 animales por tiempo.

pico máximo de respuesta ( $11.226 \pm 374$ ), nivel que descendió bruscamente 24 hs después y se mantuvo hasta la última muestra en el día 7, con cifras del orden de las 3.000 placas. Estos valores fueron coincidentes con los obtenidos en experiencias anteriores.

#### 4.1.6.4. Respuesta humoral y celular

Se estudió la acción del VJ sobre el compartimiento humoral por cuantificación del número de CFA y sobre el celular, por el método de "Swelling test", ambas ya descritas.

Como ya se describió en el punto 4.1.6.1. la inoculación de  $10^8$  GRC por vía ip, resulta óptima para producir la formación de anticuerpos sin poder detectarse en los animales respuesta celular.

Por lo tanto, para estudiar el posible efecto de la infección viral sobre el compartimiento humoral tres grupos de ratones Balb/c de 45 días de vida compuesto cada uno de ellos por 15 animales recibieron por vía ip  $10^8$  GRC, contenidos en 0,2 ml de SF. A las 24 hs, uno de los grupos fue infectado con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic, otro con la misma dosis y utilizando la misma vía pero al día 5 de la Ds y el tercer grupo permaneció como control sin infectar.

Otros tres grupos de ratones constituidos por el mismo nú

Tabla V: Acción de la infección con VJ sobre la producción en el ratón adulto de CFA hacia GRC.

Dosis de GRC	Día de la <sup>(a)</sup> infección	CFA/10 <sup>7</sup> células esplénicas <sup>(b)</sup>
10 <sup>8</sup>	+ 1	3.151 ± 438
10 <sup>8</sup>	+ 5	2.440 ± 67
10 <sup>8</sup>	-	2.155 ± 222
10 <sup>6</sup>	+ 1	9 ± 4
10 <sup>6</sup>	+ 5	2 ± 2
10 <sup>6</sup>	-	81 ± 13

(a) 10<sup>3</sup> DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic, con respecto a la Ds = día 0.

(b) Determinaciones realizadas a los 7 días de la Ds.  $\bar{X} \pm$  ES.

Tabla VI: Acción de la infección con VJ sobre la reacción de HR del ratón adultos hacia GRC.

Dosis de GRC	Día de la infección (a)	Swelling % (b)
$10^8$	+ 1	1,16 $\pm$ 0,92
$10^8$	+ 5	6,52 $\pm$ 0,18
$10^8$	-	6,94 $\pm$ 1,06
$10^6$	+ 1	10,82 $\pm$ 1,90
$10^6$	+ 5	10,94 $\pm$ 1,20
$10^6$	-	14,32 $\pm$ 1,70

(a)  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic, con respecto a la Ds = día 0.

(b) Determinaciones realizadas a los 7 días de la Ds.  $\bar{X} \pm$  ES.

mero de animales fueron sensibilizados con  $10^6$  GRC por vía ip, dosis que resulta subóptima para la formación de anticuerpos y podía por lo tanto evidenciar una eventual acción potenciadora, producida por la infección. A los 7 días de la Ds con GRC se cuantificaron las CFA por la técnica de Cunningham y la HR.

Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas V y VI respectivamente.

De su análisis surge que las modificaciones inducidas por la infección viral no pueden considerarse relevantes ya que los valores obtenidos ya sea en las CFA o en la HR se hallan en rangos biológicos compatibles con las variaciones de los respectivos métodos empleados.

#### 4.2. MODIFICACIONES EN EL CURSO DE LA INFECCION DEL RATON INOCULADO IC CON VJ PRODUCIDAS POR LA ADMINISTRACION DE DIFERENTES ESQUEMAS DE Cy

##### Diseño experimental

El efecto que produjo la Cy sobre ratones adultos Balb/c infectados con  $10^3$  DL<sub>50</sub> fue evaluado empleando diferentes esquemas de administración de la droga que fue inoculada en todos los casos por vía ip, ya sea en dosis únicas o fraccionadas.

El efecto de la droga fue evaluado en una primera etapa,

por la mortalidad que la inmunosupresión producía en el ratón adulto infectado.

Posteriormente se realizaron estudios comparativos de mortalidad, replicación viral, respuesta inmune humoral específica y cuantificación de poblaciones linfocitarias esplénicas, entre ambos esquemas.

En los casos que se detallarán más adelante estos ensayos fueron complementados con estudios anatomopatológicos y de inmunomarcación por técnicas de inmunofluorescencia y PAP.

#### 4.2.1. Empleo de dosis únicas de Cy

Antes de utilizar la Cy en los animales infectados para valorar el efecto de la inmunosupresión sobre el curso de la enfermedad, se realizaron ensayos destinados a determinar la toxicidad de la droga en el ratón Balb/c normal de 45 días de vida.

Las dosis únicas más empleadas según surge de la bibliografía, son las de 150-200 mg/kg de peso. En nuestro caso se ensayaron dosis únicas desde 50 a 400 mg/kg de peso. La Tabla VII muestra la media de la mortalidad obtenida en tres experiencias sucesivas. Como puede observarse, dosis únicas de 300 y 400 mg/kg de peso resultaron marcadamente tóxicas (40.9 y 85% respectivamente). Cuando se utilizó 200 mg/kg la toxicidad registrada varió de acuerdo a la experiencia y el promedio final alcanzado



Tabla VII: Toxicidad de la Cy administrada en dosis únicas para ratones Balb/c de 45 días de vida.

Dosis (mg/kg)	Nº de animales	Mortalidad <sup>(a)</sup> %
50	22	0
100	25	0
200	26	19,2 <sup>(b)</sup>
300	22	40,9 <sup>(b)</sup>
400	20	85,0 <sup>(b)</sup>

(a) Promedio de por los menos 3 experiencias separadas.

(b) Prueba de igualdad de dos porcentajes  $p < 0,05$ .

fue del 19,2%.

Por el contrario, con el uso de 50 y 100 mg/kg no se observó mortalidad atribuible a la droga.

Por lo tanto, los experimentos con animales infectados se llevaron a cabo empleando ya sea 50, 100 ó 200 mg/kg de Cy, administrada en diferentes momentos antes o después de la inoculación del virus el día -1 ó +4 ó +6 considerando día 0 el de la infección ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ.

En una segunda etapa se emplearon dosis únicas de Cy en animales infectados para valorar su efecto sobre el curso de la infección viral.

Como puede observarse en la Tabla VIII 50 mg/kg de Cy administrada en cualquiera de los tiempos ensayados, es decir los días -1, +4 ó +6 con respecto a la inoculación del virus no modificó el curso de la infección.

Cuando se administró 100 ó 200 mg/kg de peso ambas dosis alteraron la resistencia de los animales a la infección. En este caso, la mortalidad se hizo más evidente cuando la droga se administró 4 días después de la infección ya que empleando 100 mg alcanzó el 70,0% y con 200 mg el 85,0%. Cuando la dosis fue de 200 mg/kg inoculada un día antes de la infección, la mortalidad fue del 34,2%. Sin embargo, al considerar los porcentajes de 85,0 y 34,2% hay que tener presente que en nuestro caso la toxicidad

Tabla VIII: Mortalidad del ratón adulto infectado con VJ<sup>(a)</sup> y tratado con dosis únicas de Cy.

Cy (mg/kg)	Días de administración con respecto al virus	Mortalidad %	Nº de animales
50	- 1	0	18
	+ 4	11,1	18
	+ 6	0	18
100	- 1	11,1	18
	+ 4	70,0 <sup>(b)</sup>	20
200	- 1	34,2 <sup>(b)</sup>	38
	+ 4	85,0 <sup>(b)</sup>	20
	+ 6	11,1	18
Control virus	-	10,7	28

(a) Ratones Balb/c de 40-45 días de vida inoculados por vía ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ el día 0.

(b) Prueba de igualdad de dos porcentajes  $p < 0,05$ .

atribuible a la droga alcanzó valores del 19,2%.

#### 4.2.2. Dosis fraccionadas

En estudios paralelos a los mencionados, se decidió ensayar esquemas fraccionados de Cy que permitieran aumentar el período de administración de la droga y actuar sobre diferentes momentos de la respuesta inmune al virus con el objeto de valorar su incidencia sobre la resistencia del ratón adulto al VJ. Como en el caso anterior, los primeros ensayos estuvieron destinados a valorar la toxicidad de los distintos esquemas de Cy empleados.

Se emplearon como dosis total 100, 150 ó 200 mg, administrados en dosis de 50 ó 100 mg/kg de peso cada una.

La Tabla IX muestra que ninguno de estos esquemas resultó tóxico para el ratón Balb/c adulto.

Cuando los mismos esquemas inmunosupresores se emplearon en animales adultos infectados, se observó distintos porcentajes de mortalidad, la mayor fue obtenida con la inoculación de 50 mg/kg/dosis los días -1 +1 +4 ó -1 +1 +4 +6 (90,0 y 96,5% respectivamente) (Tabla X).

Con los restantes regímenes de inmunosupresión empleados la mortalidad no superó el 63,6%.

Del análisis de los resultados expuestos utilizando di

Tabla IX: Toxicidad de la Cy administrada en dosis fraccionadas para ratones Balb/c de 45 días de vida.

Dosis total (mg/kg)	Día de administración *	mg/kg por dosis	Nº de animales	Mortalidad (%)
100	-1 +1	50	32	0
150	-1 +1 +4	50	28	0
200	-1 +1	100	27	0
	-1 +1 +4 +6	50	40	0

\* Con respecto al día 0 que correspondería al de la infección viral.

Tabla X: Mortalidad del ratón adulto infectado con VJ<sup>(a)</sup> y tratado con dosis fraccionadas de Cy.

Dosis total (mg/kg)	Día de administración con respecto al virus	mg/kg por dosis	Nº de animales	Mortalidad (%)
100	-1 +1	50	21	57,1 <sup>(b)</sup>
150	-1 +1 +4	50	20	90,0 <sup>(b)</sup>
200	-1 +1	100	22	63,6 <sup>(b)</sup>
	-1 +1 +4 +6	50	29	96,5 <sup>(b)</sup>
Control virus	—	—	18	11,1

(a) Ratones Balb/c de 40-45 días de vida inoculados por vía ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ en el día 0.

(b) Prueba de igualdad de dos porcentajes  $p < 0,005$ .

ferentes dosis y ritmo de inoculación de Cy surge que la inmunosupresión es capaz de revertir la resistencia del ratón adulto al VJ pero que la magnitud del efecto está ligada a la administración de la droga aplicada en momentos críticos de la infección. Lo que abre una interesante posibilidad de estudio para analizar en detalle el compromiso de los diferentes componentes inmunes en la resistencia al VJ.

#### 4.2.3. Estudios complementarios comparativos entre dosis únicas y fraccionadas de Cy

Para comenzar el análisis mencionado, se decidió estudiar algunos parámetros que pudieran explicar la diferencia de comportamiento en lo que se refiere a la mortalidad de los ratones infectados e inmunosuprimidos tratados con dosis únicas o fraccionadas de Cy.

Se eligió para estos ensayos 200 mg/kg de Cy como dosis total empleada en el esquema fraccionado -1 +1 +4 +6, con el cual se había obtenido la mortalidad máxima (96,5%) y como dosis única la de 200 mg/kg, administrada el día -1 de la infección. Esta última, a pesar de la toxicidad, por ser ampliamente utilizada en otras infecciones virales en las cuales modificó la susceptibilidad de los animales al virus

Se estudiaron como parámetros en ambos modelos:

- Título de virus en cerebro

El contenido de virus en cerebro se determinó en animales de ambos grupos (Cy 200 mg -1 y 200 mg de Cy total los días -1 +1 +4 +6) y en los controles infectados. De cada uno de los grupos los animales fueron sacrificados los días 5,8, 10,15 y 25 días pi.

Los cerebros de 5 animales por tiempo se procesaron individualmente y luego titulados por el método de placas ya descripto. Punto 3.4.1.

Como puede observarse en la Figura 10 ni en los controles sin tratamiento inmunosupresor, ni en los que recibieron una dosis única de Cy pudo recuperarse virus en cerebro, en cambio en todos los cerebros provenientes de los animales tratados con el esquema fraccionado se detectó virus a partir del día 8 pi hasta el final de la experiencia en títulos de alrededor de  $10^4$  UFP/ml.

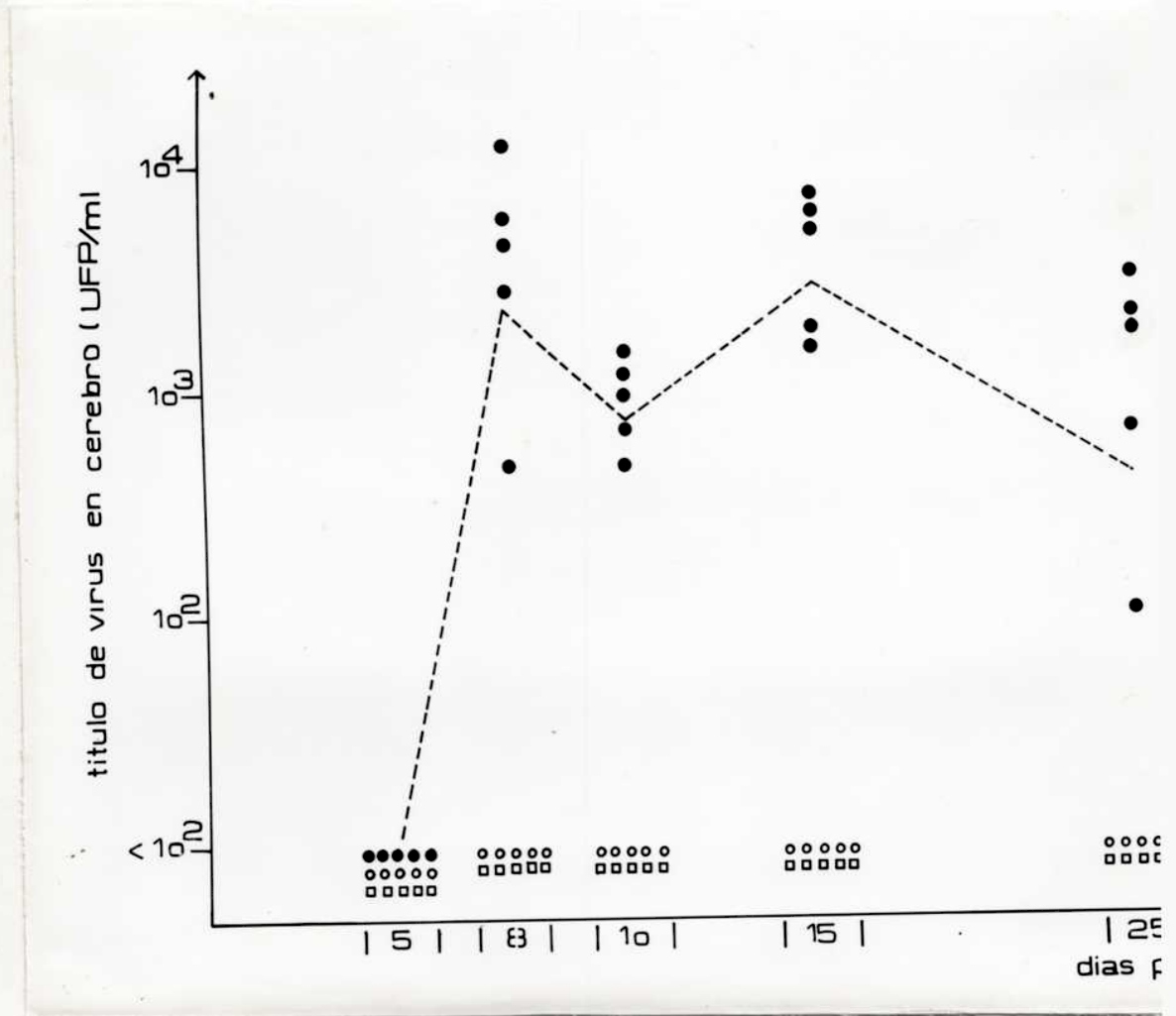
- Nivel de Ac Nt

Para determinar la influencia de la inmunosupresión sobre la respuesta inmune humoral específica hacia el virus, se investigó la presencia de Ac Nt en muestras de suero provenientes de los diferentes grupos mencionados anteriormente, las que fueron obtenidas los días 5,10,15 y 25 pi. Cada uno de



Figura 10

Título de virus en cerebro de ratones Balb/c de 45 días de vida infectados con VJ y tratados con dosis únicas o fraccionadas de Cy y sus controles



- Ratones Balb/c de 45 días de vida infectados con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ
- Ratones Balb/c de 45 días de vida infectados con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ tratados con 200 mg/kg de peso en el día -1.
- Ratones Balb/c de 45 días de vida infectados con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ tratados con 50 mg/kg de peso en los días -1 +1 +4 +6.

los puntos que figuran en la Tabla XI corresponde a la media de tres a cinco animales por tiempo.

Las determinaciones fueron realizadas en cultivo de células Vero con la técnica de virus constante-diluciones de suero. Punto 3.5.1.

La cinética de la respuesta de Ac Nt en los ratones controles infectados sin tratamiento inmunosupresor fue comparable a la ya descrita en el punto 4.1.3.

Pudo detectarse Ac Nt a partir del día 5 pi en valores de 1/10 los que aumentaron sostenidamente en todas las muestras hasta el día 25 pi, en el que se obtuvo un título de 1/160.

Cuando se administró la dosis de 200 mg/kg de Cy en el día -1 de la infección viral, la respuesta de Ac Nt fue en un todo coincidente con la de los controles, tanto en el momento de aparición de los Ac como en los títulos obtenidos.

Una evidente diferencia fue observada en los animales infectados e inmunosuprimidos con dosis fraccionada de Cy administrada pre y post-infección. En este caso, la respuesta, en todos los tiempos estudiados, fue positiva recién a partir de las muestras obtenidas el día 15 pi y no superó los valores de 1/10.

En base a estos resultados, que mostraban que el único grupo en que podía apreciarse diferencias en la mortalidad, tí

Tabla XI: Niveles de anticuerpos neutralizantes séricos en animales infectados y tratados con Cy y sus controles sin tratamiento.

Días pi	Cy + V		Virus (control)
	Dosis únicas <sup>(1)</sup>	Dosis fraccionadas <sup>(2)</sup>	
5	1/10	< 1/10	1/10
10	1/10	< 1/10	1/20
15	1/80	1/10	1/80
25	1/160	1/10	1/160

Ratones Balb/c adultos infectados con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic.

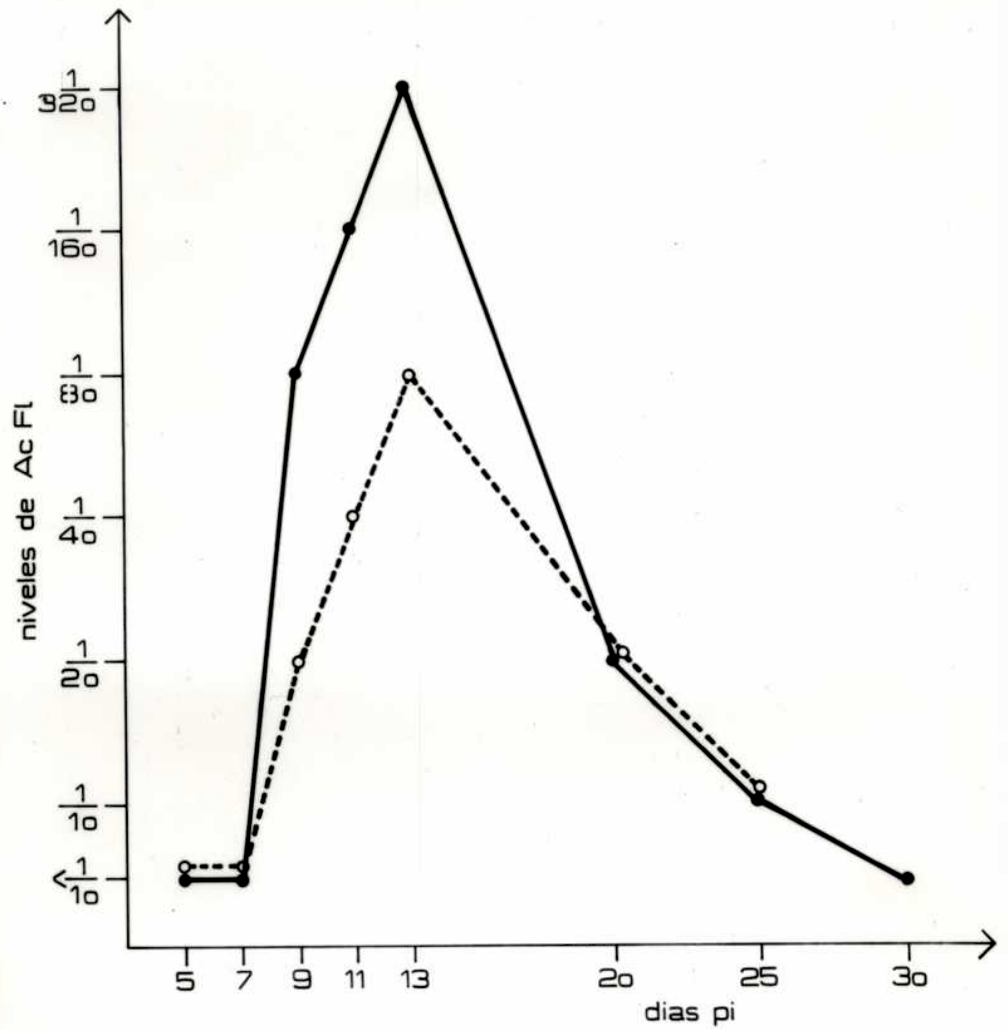
(1) 200 mg/kg de peso de Cy el día -1 de la infección viral.

(2) 200 mg/kg de peso de Cy (dosis total) administrada en dosis de 50 mg cada una los días -1 +1 +4 +6, siendo 0 el día de la infección viral.

Los valores de Ac Nt corresponden a la media de 3 a 5 valores individuales por tiempo.

Figura 11

Niveles de anticuerpos fluorescentes séricos en animales infectados con Cy y sus controles sin tratamiento inmunosupresor.



- Ratones Balb/c de 45 días de vida infectados con  $10^3$  DL<sub>50</sub> por vía ic.
- -○ Ratones Balb/c de 45 días de vida infectados con  $10^3$  DL<sub>50</sub> por vía ic tratados con 4 dosis de 50 mg de Cy cada una 10<sup>-1</sup> +1 +4 +6, siendo 0 el día de la infección viral.

Los valores que figuran corresponden al promedio de 3 valores individuales por tiempo.

tulo de virus en cerebro y en los Ac Nt era el que recibió el esquema fraccionado de Cy, fue éste el modelo elegido para realizar los estudios complementarios de detección de Ac Fl, anatomopatológicos y de inmunomarcación de Ag viral en cerebro.

Los resultados que se hallan expresados en la Figura 11 indicaron que tanto en el grupo de ratones infectados e inmunosuprimidos como en de los controles infectados sin tratamiento inmunosupresor, los Ac Fl aparecen a partir del 9° día pi. Sin embargo, los niveles alcanzados difirieron en ambos grupos, ya que, en general se registraron en los animales inmunosuprimidos niveles más bajos que los observados en el grupo control.

#### - Estudios histológicos

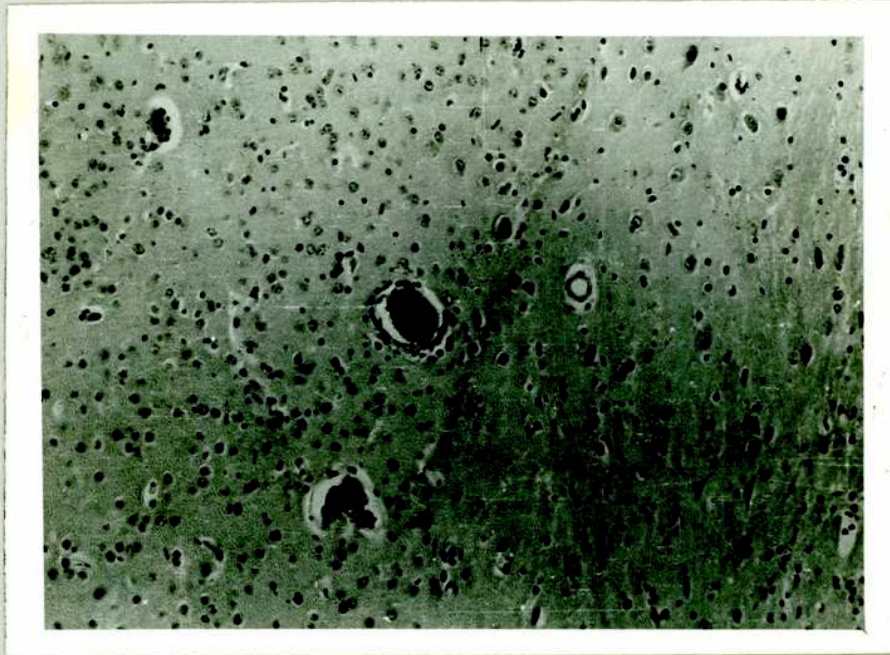
Los estudios anatomopatológicos revelaron que los animales infectados e inmunosuprimidos con el esquema de dosis fraccionadas, desarrollaron un proceso inflamatorio diseminado, acompañado de una notable vasodilatación con hiperhemia, exudado perivascular de células mononucleares y un grado variable de inflamación de las meninges (Figura 12). Asimismo se observaron focos aislados de reblandecimiento y hemorragias antiguas que se evidenciaron por la presencia de macrófagos cargados de hem siderina. Alteraciones similares pero de menor intensidad fueron halladas en el 50% de los animales infectados sin tratamiento. En ningún caso se detectó necrosis o hemorragias (Figura 13).

Figura 12



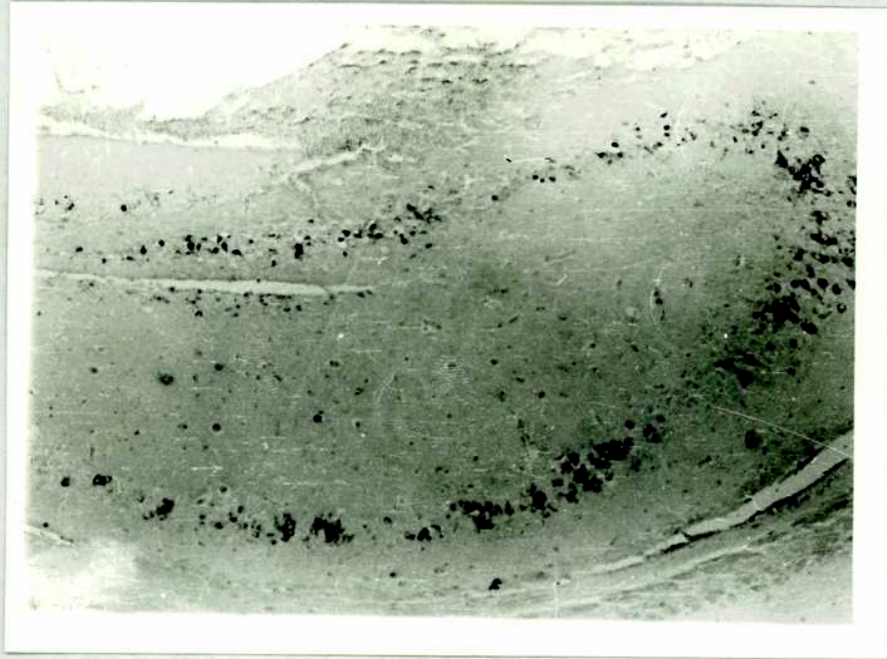
Cerebro de ratones infectados e inmunosuprimidos con el esquema de dosis fraccionadas de Cy. Se observa un notable vasodilatación con hiperhemia y exudado perivascular de células mononucleares. 144 x.

Figura 13



Cerebro de ratones infectados sin tratamiento inmunosupresor. Se observan lesiones de menor intensidad en el 50% de los animales. 144x.

Figura 14



Cerebro de ratones infectados e inmunosuprimidos con el esquema de dosis fraccionadas de Cy. Se observa inmunomarcación positiva en células de hipocampo. Método PAP. 74 x.



- Estudios de Inmunomarcación

Por estudios de inmunomarcación con peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), alrededor del 80% de los ratones infectados y tratados con Cy exhibieron en cerebro una leve a moderada concentración de Ag Junín, localizada en neuronas aisladas y/o piramidales del hipocampo; el Ag Junín estuvo ausente en todas las muestras de cerebro provenientes de los controles sin tratar (Figura 14).

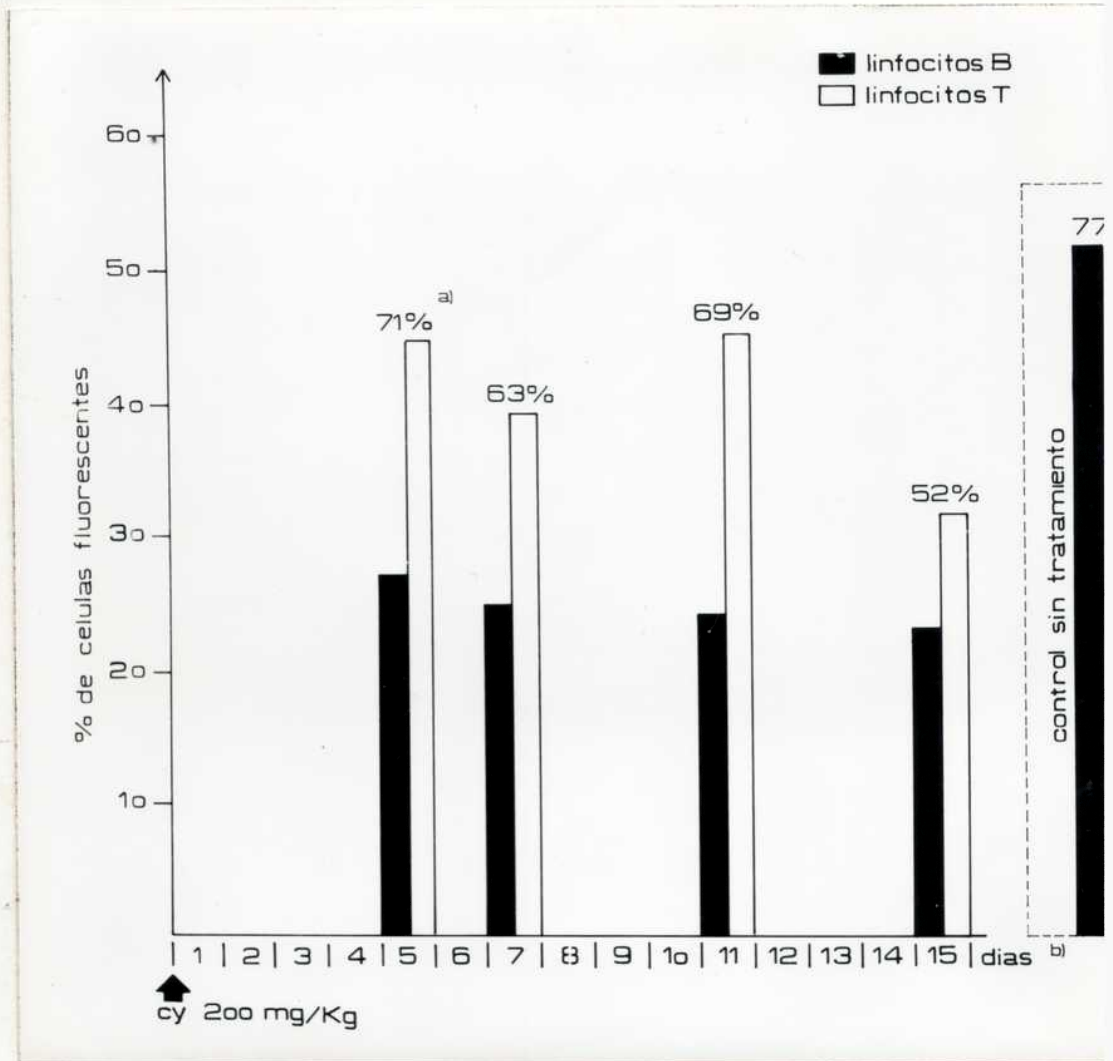
- Cuantificación de linfocitos esplénicos B y T

Con el fin de determinar las variaciones que los dos esquemas de administración de Cy, es decir una única dosis de 200 mg/kg, o bien 200 mg/kg fraccionadas en cuatro dosis de 50 mg/kg cada una, podían inducir en las poblaciones linfocitarias esplénicas T y B se valoró el porcentaje de ambos tipos celulares en el bazo de animales sin infectar y tratados con Cy, en dosis y ritmos similares a los empleados en los ensayos recién descritos. A los 5, 7, 11 y 15 días después de la primera o única dosis de Cy se les extrajo los bazos, los que fueron tratados como se describió en el punto 3.7.4. y se cuantificó en ellos los linfocitos T y B empleando la técnica de IFI.

Los resultados obtenidos se resumen en las Figuras 15 y 16.

Figura 15

Poblaciones linfocitarias de ratones Balb/c adultos tratados con Cy y controles sin tratamiento determinados por IFI.

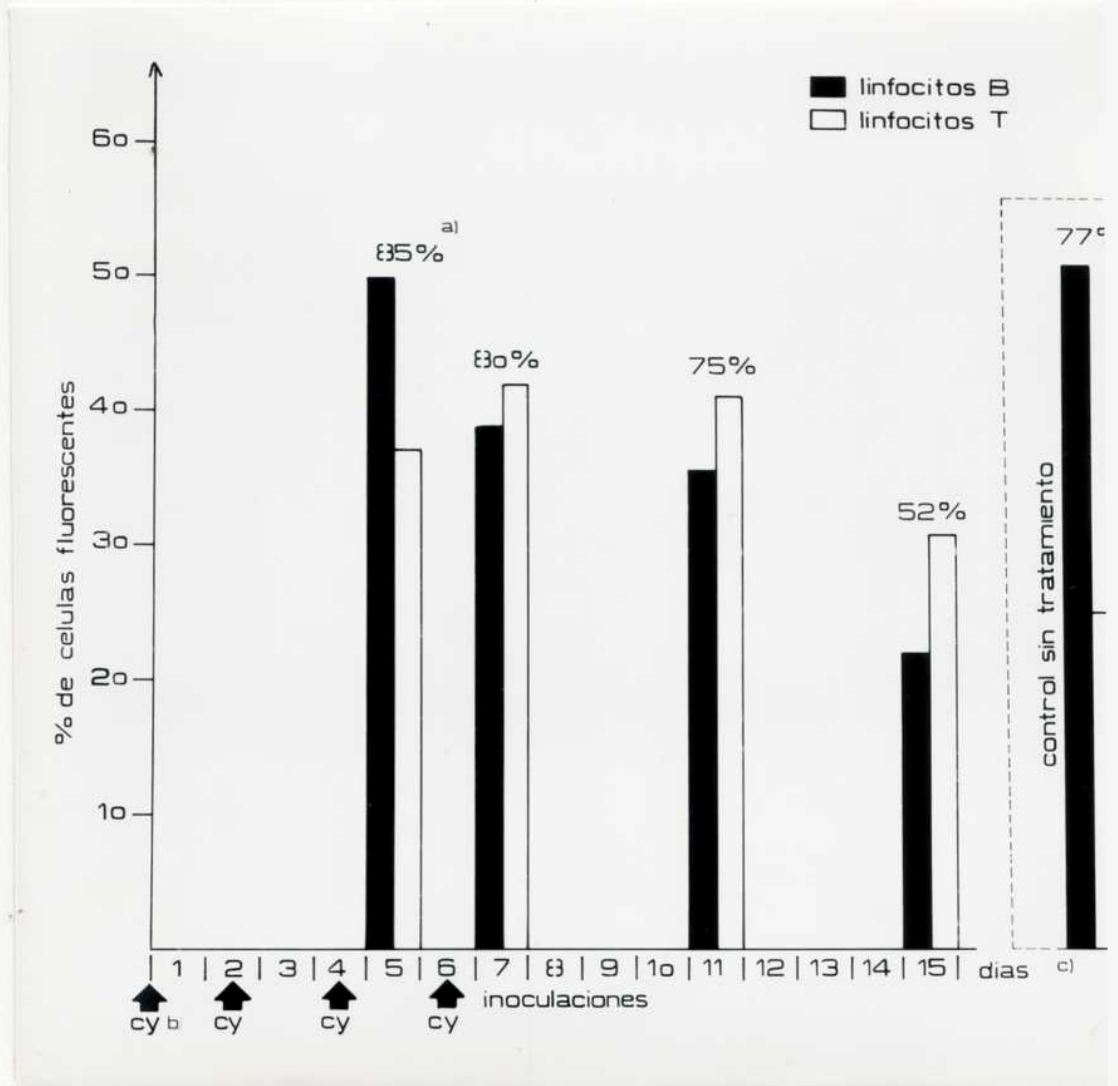


a) Estos valores indican la suma de porcentajes de linfocitos T y B.

b) Las muestras fueron tomadas a los 5,7,11 y 15 días después de la administración de Cy.

Figura 16

Poblaciones linfocitarias de ratones Balb/c adultos tratados con Cy y troles sin tratamiento determinados por IFI.



- a) Estos valores indican la suma de porcentajes de linfocitos T y B
- b) Todos los ratones recibieron cuatro dosis de 50 mg/kg de Cy cada vía ip.
- c) Las muestras fueron tomadas a los 5,7,11 y 15 días después de la ción de Cy.

Como puede observarse en el bazo de ratones normales de 45 días de vida el porcentaje de linfocitos B y T es de 51 y 25% respectivamente.

La administración de una sola dosis de 200 mg/kg de Cy (Figura 15) produce ya al día 5 una caída del orden del 50% de los linfocitos B. Esta disminución se mantuvo constante hasta la última muestra estudiada (entre 22 y 27% vs 51,7% de los controles).

A diferencia de lo anterior con dosis fraccionadas (Figura 16), los valores de linfocitos B se mantuvieron dentro de los límites normales en el día 5 momento en que los animales habían recibido 3 dosis de 50 mg de Cy, disminuyendo paulatinamente a partir del día 7 (1 día después de la cuarta inoculación) hasta alcanzar en el día 15 los mismos valores que los observados con la dosis única de 200 mg/kg.

En lo que respecta a los linfocitos T, tanto con la dosis única como con dosis fraccionadas, se registró un llamativo aumento en el porcentaje, encontrándose en todos los tiempos estudiados valores por encima de los normales (30,0-40,0 vs 25,5% de los controles). Se considera que este aumento es relativo, no real, y que refleja la merma en el recuento de linfocitos B. Esta conclusión se basa en el hecho de que, en todos los tiempos estudiados y con ambos regímenes inmunosupresores, la suma

de los porcentajes de linfocitos T y B se mantiene relativamente constante y es similar a la de los controles sin tratamiento.

Hace excepción a esto los valores hallados en el día 15 en ambos grupos de animales tratados, donde la sumatoria de los porcentajes de T y B es, en ambos grupos, del 52,0% lo que indica que los dos tipos celulares están realmente disminuídos.

Se concluye por lo tanto que con las dosis y ritmos en sayados, la Cy afecta preponderantemente el número de linfocitos B esplénicos, pero que también la cantidad de células T se altera como resultado del tratamiento inmunosupresor.

#### 4.3. MODIFICACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE HACIA GRC INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACION DE UN ESQUEMA FRACCIONADO DE Cy

Los resultados presentados en el punto anterior corresponden al efecto que produjo la administración de Cy sobre las poblaciones linfocitarias esplénicas en reposo, es decir, sin ninguna estimulación antigénica conocida.

Ha sido ampliamente demostrado que la Cy actúa predominantemente sobre células en división activa. En base a ello, se decidió evaluar su efecto sobre los linfocitos esplénicos

de animales estimulados antigénicamente con GRC.

En este caso, la actividad de ambas subpoblaciones linfocíticas se valoró por sus manifestaciones funcionales, es decir la cuantificación de linfocitos B como células formadoras de anticuerpos (CFA) utilizando la técnica de Cunningham y los linfocitos T, como células efectoras de la reacción de HR empleando la técnica de hinchazón de la pata ("Swelling test").

#### 4.3.1. Acción de la inmunosupresión sobre las respuestas humoral y celular hacia GRC

Como se recordará, el esquema de dosis fraccionadas de 50 mg/kg de Cy cada una administradas los días -1,+1,+4,+6 (siendo el día 0 el de la infección viral con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ) producía en el ratón adulto una enfermedad letal (96,5% promedio total de mortalidad) con altos títulos de virus y lesiones anatomopatológicas a nivel del SNC.

Dado que este esquema experimental de inmunosupresión, era el que producía las mayores modificaciones en el curso de la infección del ratón adulto, analizar su acción inmunosupresora en un modelo experimental de manejo conocido, en el que pudiese cuantificarse el efecto sobre la inmunidad humoral y celular. Se emplearon entonces ratones Balb/c adultos estimulados con  $10^8$  GRC por vía ip valorándose el efecto de la inmunosupresión tanto sobre las CFA como sobre la HR.

La Ds de  $10^8$  fue elegida ya que como ha sido mencionado producía buena respuesta de CFA y baja HR. Por lo tanto, podía detectarse en él la acción de la Cy sobre la funcionalidad de linfocitos B y la alteración sobre algún mecanismo supresor que fuese responsable de la pobre respuesta de HR.

Los ensayos realizados en esta primera etapa demostraron que este esquema de inmunosupresión redujo en un 99,9% la cantidad de CFA presentes en el día 7 de la estimulación antigénica ( $4.150 \pm 852$  vs  $6 \pm 4$ ) de los controles sin tratamiento inmunosupresor.

En lo que respecta a la reacción de HR desencadenada también al séptimo día de la sensibilización se registró un valor de  $8,27 \pm 1,33$  en los animales tratados y de  $1,55 \pm 0,35$  en los controles, lo que representa más de un 530% de aumento.

Estos datos demostraron que el esquema inmunosupresor empleado produjo una intensa modificación en ambos compartimientos de la respuesta inmune.

Sin embargo, la valorización del efecto de la Cy de la manera ensayada, es decir en el día +7 de la sensibilización, reflejaba el resultado final, es decir, la sumatoria de efectos de cada una de las cuatro dosis de Cy administradas, pero no ofrecía información acerca del momento a partir del cual el esquema inmunosupresor producía dichas alteraciones. Por ejemplo

la dosis de 50 mg/kg inoculada 24 hs antes de la estimulación antigénica si actuaba sobre la célula precursora, podría resultar la única responsable de la reducción de CFA observada 7 días más tarde.

Con el fin de conocer entonces la acción de cada una de las cuatro dosis de Cy sobre la respuesta inmune se diseñaron experimentos tendientes a disecar el esquema de inmunosupresión empleado. Para ello a diferentes grupos de ratones que recibieron  $10^8$  GRC en el día 0, se les inoculó Cy (50 mg/kg de peso por vía ip) los días -1, 0 -1 +1 +4, 0 -1 +1 +4 +6, como se detalla en el siguiente protocolo:

Grupo	Dosis total Cy mg/kg	D í a				
		-1	0	+1	+4	+6
I	50	Cy	GRC	-	-	-
II	100	Cy	GRC	Cy	-	-
III	150	Cy	GRC	Cy	Cy	-
IV	200	Cy	GRC	Cy	Cy	Cy
V	-	-	GRC	-	-	-

A los 7 días de la inmunización se cuantificó en cada uno de los grupos experimentales la reacción de HR y las CFA esplénicas, de acuerdo a las técnicas descriptas en 3.8. y 3.9.



respectivamente.

Como puede observarse en la Tabla XII, estas experiencias pusieron de manifiesto que la administración de dosis fraccionadas de Cy de 50 mg (día -1), 100 mg (-1 +1) y 150 mg (-1 +1 +4) permiten obtener niveles progresivamente mayores de HR ( $\bar{X}$  8,65  $\pm$  1,30;  $\bar{X}$  15,01  $\pm$  0,82 y  $\bar{X}$  21,35  $\pm$  3,25 respectivamente). Sin embargo, cuando los animales recibieron la cuarta dosis de 50 mg/kg de Cy en el día +6, los niveles de HR cayeron abruptamente a  $\bar{X}$  7,96  $\pm$  1,26.

En la misma Tabla puede apreciarse que, las CFA descendieron a menos de la mitad del valor control con una sola dosis administrada en el día -1, al 23% con dos dosis, alrededor del 1% con tres dosis y por último a menos del 1% con el esquema completo de inmunosupresión. Es decir, en este caso, a diferencia de lo que se observó en la reacción de HR; la cuarta dosis de Cy en el día +6 no modificó el efecto obtenido con las tres dosis anteriores.

La brusca caída de la HR observada cuando se administró la cuarta dosis de Cy mereció una consideración especial. Se podría asumir que esta acción era debida al efecto sumatorio de las cuatro dosis de Cy o bien a la acción individual de los 50 mg/kg inoculados en el día +6 sobre el linfocito efector de la HR ( $T_{HR}$ ).

Tabla XII: Acción de distintas dosis y ritmo de inoculación de Cy sobre la respuesta inmune hacia GRC del ratón adulto.

Cy	Días (a)	HR (b)	CFA/10 <sup>7</sup> células (c)
Dosis total (mg/kg)		$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$
50	-1	8,65 $\pm$ 1,30	1.878 $\pm$ 179
100	-1 +1	15,01 $\pm$ 0,82	1.203 $\pm$ 153
150	-1 +1 +4	21,35 $\pm$ 3,25	64 $\pm$ 13
200	-1 +1 +4 +6	7,96 $\pm$ 1,26	8 $\pm$ 4
		1,10 $\pm$ 0,28	5.151 $\pm$ 853

(a) Con respecto a la sensibilización ip con 10<sup>8</sup> GRC.

(b) Reacción de hipersensibilidad retardada valorada por la técnica de "swelling".

(c) Células formadoras de anticuerpos por el método de Cunningham.

Por lo tanto para establecerlo, se diseñaron una serie de experimentos que se detallan a continuación.

Debido a que, como ya fue indicado bajas dosis de GRC inducen buena respuesta de HR, se administró a tres grupos de 8 ratones cada uno  $10^6$  GRC por vía ip. Dos de ellos fueron tratados con dosis únicas de Cy en el día +6, uno con 50 mg/kg y el otro con 200 mg/kg a fin de establecer una posible dosis dependencia del efecto supresor y el tercero fue dejado como control de HR. Como en todas las experiencias ya descritas los animales fueron desencadenados a los siete días post-sensibilización.

Los resultados, que se observan en la Tabla XIII, muestran que la administración de la droga en el día +6, es la responsable de la caída de los niveles de HR y que este efecto no es dosis dependiente, ya que en ambos grupos tratados con Cy se observó una disminución de la reacción del 40,50% con respecto al grupo control sin tratamiento.

#### 4.4. PARTICIPACION DE LA INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL EN LA RESISTENCIA DEL RATON ADULTO A LA INFECCION CON VJ

Habiendo determinado como se señaló en el punto 4.3. la acción que el esquema de dosis fraccionadas de Cy, producía sobre los compartimientos humoral y celular de la respuesta

Tabla XIII: Acción de la Cy sobre el linfocito efector de la hipersensibilidad retardada.

Cy	Día (a)	HR (b)
Dosis total		$\bar{X} \pm ES$
(mg/kg)		
	-	14,46 $\pm$ 1,19
50	+6	8,08 $\pm$ 1,9
200	+6	7,92 $\pm$ 1,22

(a) Con respecto a la sensibilización ip con  $10^8$  GRC.

(b) Reacción de hipersensibilidad retardada valorada por la técnica de "swelling".

inmune, se retomó el modelo ratón adulto infectado ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ e inmunosuprimido con ese régimen inmunosupresor, con el fin de evaluar la participación de los mecanismos inmunes en la resistencia a la infección. Como se recordará, este tratamiento con Cy revertía la resistencia del ratón adulto al VJ. Por lo tanto, en este modelo se realizaron las siguientes experiencias de reconstitución por transferencia pasiva.

#### 4.4.1. Inmunidad humoral

Con el objeto de determinar el papel de los anticuerpos se realizaron ensayos de transferencia utilizando anticuerpos obtenidos a partir de líquido ascítico inmune (LAI), como fue explicado en el punto 3.10.1, ya sea en su estado nativo (título 1/160) o bien gammaglobulinas (título 1/1280) obtenidas por precipitación como se detalló en el punto 3.5.3.1.

##### 4.4.1.1. Determinación del esquema experimental de transferencia pasiva

Como primer paso, se llevaron a cabo varios ensayos tendientes a determinar la dosis y ritmo de inoculación de LAI adecuados para obtener títulos de anticuerpos antiviral homologables a los que fisiológicamente se producen en el ratón adulto infectado. Simultáneamente se determinó el período de

persistencia en suero de los anticuerpos específicos, con las dos concentraciones de LAI transferidos.

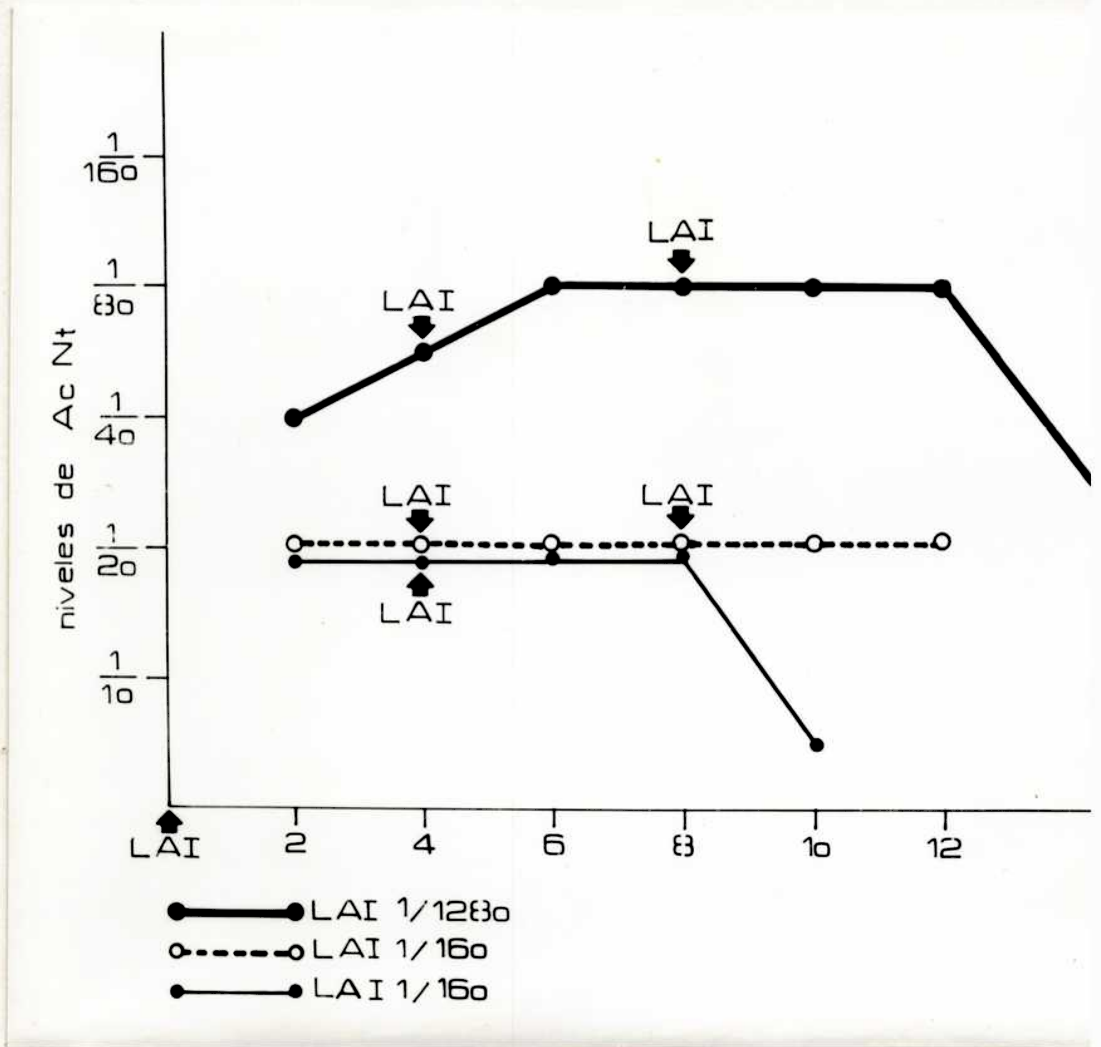
Para ello 36 ratones Balb/c normales fueron inoculados por vía ip ya sea con dos o tres dosis de LAI nativo o con tres de la gammaglobulina. En cada dosis se administró 0,4 ml a intervalos de cuatro días.

En el caso de la gammaglobulina se sacrificaron dos animales por tiempo, cada dos días desde el día 2 y hasta el día 15 posterior a la primera inoculación de LAI. Cuando se administraron dos dosis de LAI nativo, las muestras fueron tomadas con los mismos intervalos los días 2, 4, 6, 8 y 10 a partir de la primera inoculación de anticuerpos. En el caso de las tres dosis se tomó además una muestra el día 12. En todos los casos el título de Ac Nt de cada una de las muestras individuales fue determinado como se describió en el punto 3.5.1.

Con la transferencia pasiva de LAI nativo (1/160) en las condiciones mencionadas en ninguna de las muestras se obtuvo un título de Ac Nt mayor de 1/20 (Figura 17). De los datos obtenidos con el esquema de 2 dosis puede inferirse que la persistencia del anticuerpo transferido es del orden de los 4 días. Como era de esperarse con la administración de LAI concentrado (título 1/1280) se registró un nivel de anticuerpos mayor entre 1/60 y 1/80 hasta los 12 días es decir, 4 días después de la última inoculación,

Figura 17

Niveles y persistencia de anticuerpos neutralizantes en adultos normales transferidos pasivamente con líquido aséptico (LAI).



decaendo 3 días más tarde a niveles de 1/20 (Figura 17). Estos últimos datos confirmaron la duración del período de persistencia en suero del anticuerpo transferido.

De estos resultados surge que la inoculación del LAI con centrado con intervalos de 4 días produce un nivel de anticuerpos sostenido y en títulos comparables a los originados por la infección, hasta 7 días después de la última inoculación.

#### 4.4.1.2. Influencia de la transferencia pasiva de anticuerpos sobre el curso de la infección viral

Una vez determinado el ritmo apropiado de inoculación de anticuerpos, se procedió a realizar las experiencias de transferencia pasiva a los animales adultos infectados e inmunosuprimidos.

En una primera etapa se ensayó el poder protector de los bajos niveles de anticuerpos que se obtuvieron con el LAI nativo inoculando 0,4 ml los días +1 +5 y +9 pi a un lote de 27 ratones Balb/c de 45 días de vida infectados por vía ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de la cepa XJ de VJ (día 0) y tratados con Cy los días -1 +1 +4 +6 (grupo Cy + V + LAI). Se utilizaron como controles 3 animales a los cuales se les administró líquido ascítico normal (LAN) con el mismo esquema anterior (Cy + V + LAN), 19 animales infectados y tratados con Cy (V + Cy) y 10 animales infectados solamente (grupo V) (Tabla XIV).



Tabla XIV: Porcentaje de mortalidad acumulativa en ratones Balb/c infectados, inmunosuprimidos y tratados con LAI.

M O R T A L I D A D				
Días pi	Grupo (1)	Grupo (2)	Grupo (3)	Grupo (4)
	V + Cy + LAI (27 animales)	V + Cy + IAN (13 animales)	V + Cy (19 animales)	control virus (10 animales)
12	3,7	-	-	-
13	11,1	15,4	5,2	-
14	22,2	30,8	41,6	-
15	29,6	46,2	57,2*	10
16	40,7	53,9*	67,6	-
17	44,7	-	-	-
18	48,1	-	-	-
	-	-	72,8	-
26	-	61,5	-	-
30	51,8*	-	-	-
33	-	69,2	-	-
34	55,5	-	78,9	-
<b>Mortalidad final</b>	<b>55,5</b>	<b>69,2</b>	<b>78,9</b>	<b>10</b>

(1) Animales de 45 días de vida infectados en el día 0 con  $10^3$ DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic, inmunosuprimidos con Cy los días -1,+1,+4,+6 y tratados con 0,4 ml de LAI nativo (título 1/160) los días +1,+5 y +9 pi (Grupo Cy + V + LAI).

(2) Idem anterior pero tratados con IAN.

(3) Controles sin transferencia.

(4) Controles infectados solamente.

\* 50% de mortalidad.

Los ratones de todos los grupos fueron controlados diariamente, registrándose la mortalidad y los signos de enfermedad hasta los días 35 pi.

Como puede observarse en la Tabla XIV, el tratamiento con el LAI nativo empleado disminuyó la mortalidad en un 23,4% con respecto a los animales que no recibieron anticuerpos (55,5% vs 78,9% de mortalidad).

En el grupo transferido se observó un marcado retardo en el 50% de la mortalidad, que puede considerarse que ocurrió alrededor del día 24 pi (48,1% el día 18 pi y 51,8% el día 30 pi) con respecto, ya sea al grupo V + Cy + LAN (50% entre los días 15-16 pi o el control V + Cy 50% entre los días 14 y 15 pi).

En base a estos resultados que mostraban la poca protección obtenida con el tratamiento ensayado, se decidió reforzarlo mediante la administración de las mismas dosis individuales de LAI, pero inoculadas con mayor frecuencia, es decir cada 2 días, comenzando además el día previo a la infección viral.

En consecuencia, un lote de 29 ratones adultos Balb/c infectados al día 0 y tratados con Cy como se describió para el experimento anterior, recibieron 0,4 ml de LAI (título 1/160) los días -1,+1,+3,+5,+7 y +9 con respecto a la infección (grupo Cy + V + LAN).

Otros 18 animales que recibieron LAN con el mismo esquema

Tabla XV: Porcentaje de mortalidad acumulativa en ratones Balb/c infectados, inmunosuprimidos y tratados con un esquema reforzado de LAI.

Días pi	Grupo (1)	Grupo (2)	Grupo (3)	Grupo (4)
	V + Cy + LAI (29 animales)	V + Cy + LAN (18 animales)	V + Cy (20 animales)	control virus (10 animales)
11	3,44	5,55	-	-
12	10,34	16,66	-	-
13	-	44,44	20	-
14	17,24	55,55*	35	-
15	24,13	77,77	65*	-
16	37,93	83,32	70	-
17	51,72*	-	90	-
18	62,06	83,32	-	-
19	-	-	100	-
20	65,51	94,4	-	-
Mortalidad final	65,51	94,4	100	0

- (1) Animales de 45 días de vida infectados en el día 0 con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic, inmunosuprimidos con Cy los días -1,+1,+4,+6 y tratados con 0,4 ml de LAI nativo (título 1/160) los días -1,+1,+3,+5,+7,+9 pi (Grupo Cy + V + LAI).
- (2) Idem anterior pero tratados con LAN.
- (3) Controles sin transferencia.
- (4) Controles infectados solamente.
- \* 50% de mortalidad.

(grupo Cy + V + LAN), 20 animales infectados y tratados con Cy y 10 animales infectados solamente fueron utilizados como controles (Tabla XV). La morbimortalidad fue registrada como se describiera previamente.

Con este esquema reforzado de transferencia pasiva de anticuerpos se produjo una disminución en el porcentaje de mortalidad de alrededor del 35% con respecto a los controles (grupo V + Cy) que fue similar a la obtenida con el primer esquema.

Los resultados de las Tablas XIV y XV demuestran que la transferencia pasiva de anticuerpos homólogos antiviral, confiere cierto grado de protección al ratón adulto infectado e inmunosuprimido con Cy.

Con el fin de evaluar si mediante la administración de LAI "concentrado" (título 1/1280) era posible obtener un mayor efecto protector, se realizó una tercera experiencia de transferencia de anticuerpos, utilizando el esquema que, como se recordará, era adecuado para obtener en los receptores normales un nivel sostenido de anticuerpos del orden de 1/40 es decir inoculándolos los días +1 +5 +9 pi.

Para ello un lote de 18 animales infectados e inmunosuprimidos recibieron tratamiento con LAI (grupo V + Cy + LAI) utilizándose como controles 15 animales transferidos con LAN (grupo V + Cy + LAN), 18 animales infectados e inmunosuprimidos (grupo

Tabla XVI: Mortalidad acumulativa en animales Balb/c infectados e inmunosuprimidos que recibieron LAI "concentrado" y sus controles.

M O R T A L I D A D				
Días pi	Grupo (1)	Grupo (2)	Grupo (3)	Grupo (4)
	V + Cy + LAI (18 animales)	V + Cy + LAN (15 animales)	V + Cy (18 animales)	V (10 animales)
8	-	-	-	10
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	13,33	-	-
13	-	20,00	16,66	-
14	-	46,66	50,00*	-
15	11,11	73,33	72,22	-
16	-	86,66	88,88	-
17	33,33	93,33	94,44	-
Mortalidad final	33,33	93,33	94,44	10

(1) Animales de 45 días de vida infectados en el día 0 con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic, inmunosuprimidos con Cy los días -1,+1,+4,+6 y tratados con 0,4 ml de LAI "concentrado" (título 1/1280) los días +1,+5 y +9 pi (Grupo Cy + V + LAI).

(2) Idem anterior pero tratados con LAN.

(3) Controles sin transferencia.

(4) Controles infectados solamente.

\* 50% de mortalidad.

V + Cy), y 10 animales infectados solamente (grupo V).

Analizando los datos que se muestran en la Tabla XVI, se observa una marcada disminución de la mortalidad en el grupo de animales infectados, inmunosuprimidos y tratados con LAI, con respecto a los controles infectados e inmunosuprimidos solamente (33,33% vs 94,4%). La mortalidad del grupo control virus no difirió de la observada normalmente, ya que alcanzó el 10,0%.

#### 4.4.1.3. Correlación entre la protección alcanzada por la transferencia pasiva de anticuerpos y el contenido viral en cerebro

Habiéndose establecido que las diferencias en la efectividad de la protección del ratón adulto infectado e inmunosuprimido, dependían del nivel de anticuerpos transferidos, se estudió si la protección observada se correlacionaba con la multiplicación de virus en cerebro.

Para valorar este punto, se realizaron las experiencias empleando los dos tipos de LAI usados anteriormente, es decir, el de bajo y el de alto título de Ac Nt, administrando a los animales 0,4 ml de LAI por vía ip los días +1, +5 y +9 pi.

En todos los casos se procesaron muestras individuales de cerebro y sangre provenientes de 2 animales por tiempo obtenidas los días 8, 11 y 14 pi. Entre 13 y 15 animales de los grupos

tratados con LAI y sus respectivos controles (infectados, inmunosuprimidos e infectados solamente), fueron observados diariamente hasta los 35 días pi, registrándose la mor**bi**mortalidad. El contenido del virus en cerebro fue titulado por el método de unidades formadoras de placas y el nivel de Ac Nt en suero, se determinó por la técnica de virus constante-diluciones de suero. Ver puntos 3.4.1. y 3.5.1. respectivamente).

Los resultados obtenidos con ambas concentraciones de anticuerpos están representados en las Figuras 18 y 19 respectivemente.

Cuando se administró LAI nativo de bajo título, a pesar de la esperada disminución de alrededor del 30% en la mortalidad, confirmada en este ensayo, la concentración de virus en cerebro no difirió de la obtenida en los controles sin tratamiento.

Un hecho similar se observó cuando se empleó el LAI concentrado con un título de 1/1280 ya que tampoco el nivel de virus en cerebro difirió del de los controles. Por lo tanto es posible afirmar que si bien los anticuerpos son capaces, en ciertas condiciones experimentales, de proteger al ratón adulto del efecto que la inmunosupresión produce en el curso de la infección viral no modifican la concentración de virus en cerebro.

Es de señalar que la concentración de anticuerpos séricos detectada en los receptores fue coincidente con las halladas en

Figura 18

Título de virus en cerebro y niveles de anticuerpos neutralizantes en ratones infectados e inmunosuprimidos que recibieron tratamiento con LAI (1/160) y sus controles.

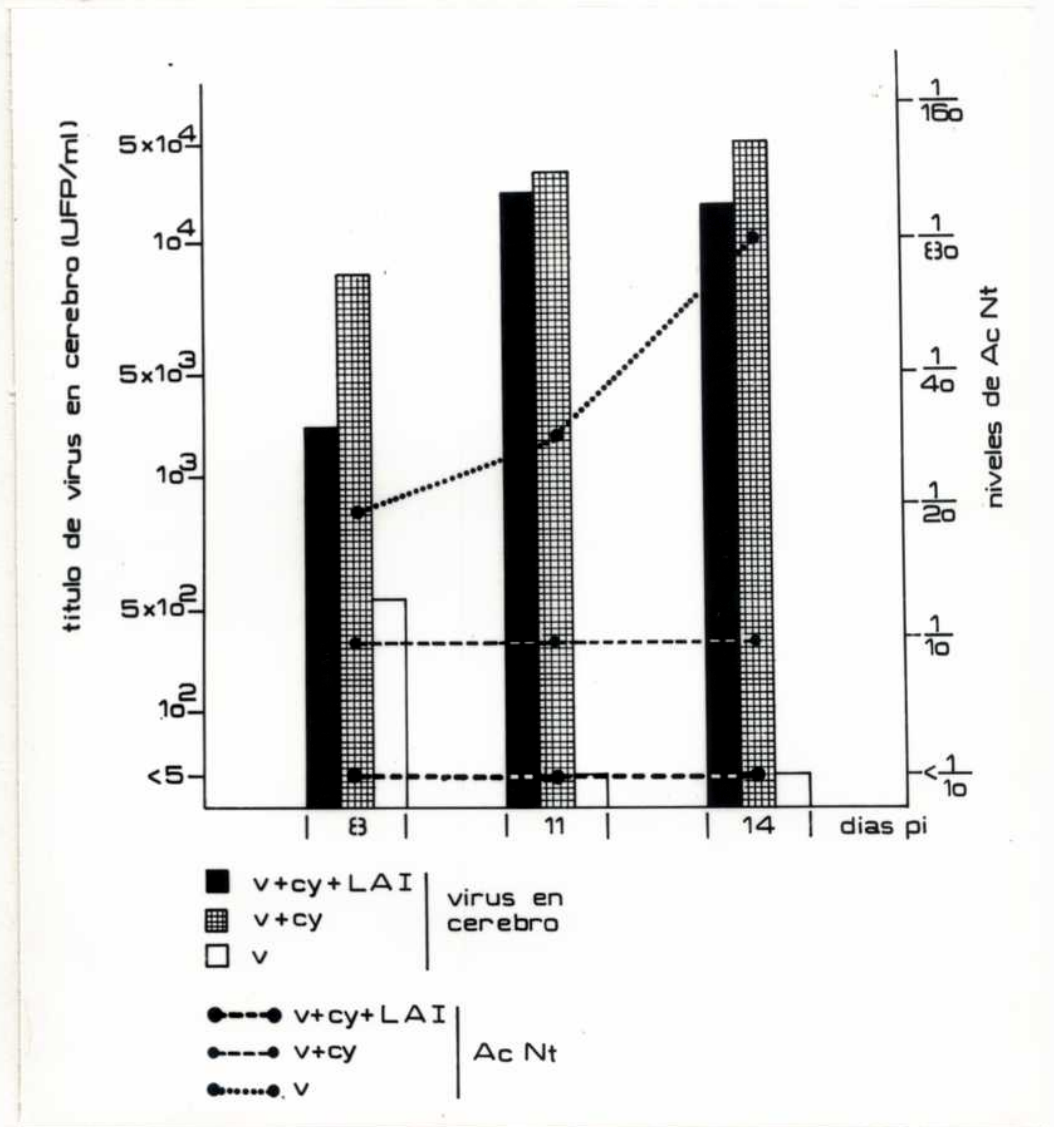
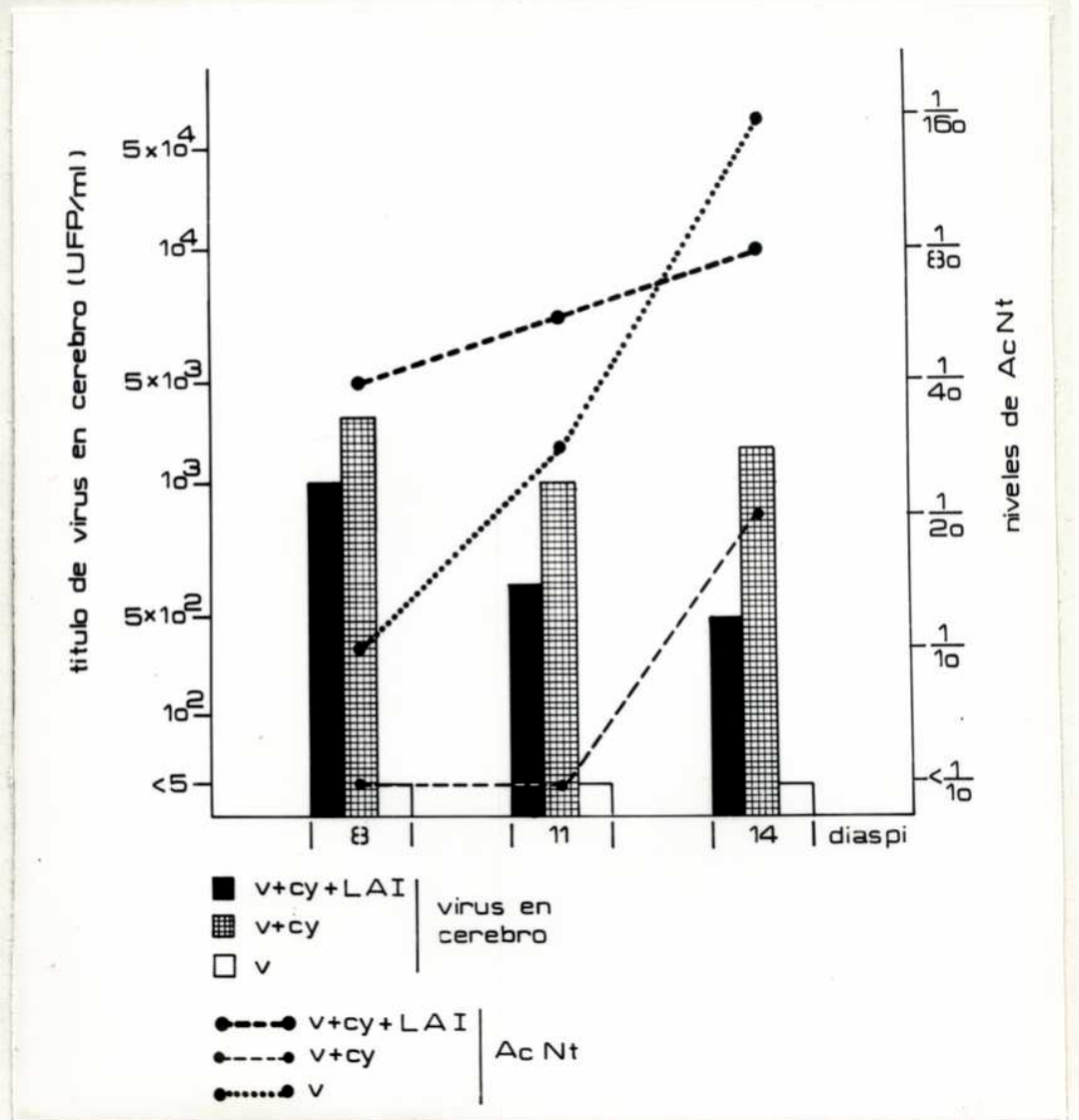




Figura 19

Título de virus en cerebro y niveles de anticuerpos neutlizantes en ratones infectados e inmunosuprimidos que recibieron tratamiento con LAI (1/1280) y sus controles.



los ensayos previos de transferencia pasiva efectuados en animales normales. Ver punto 4.4.1.1.

#### 4.4.2. Inmunidad celular

Como se mencionó en la Introducción del punto 4.4. el objeto de estas experiencias fue el de determinar la participación de los mecanismos de inmunidad celular en la resistencia del ratón adulto a la infección con VJ, particularmente el de la población de linfocitos T.

##### 4.4.2.1. Ensayos de enriquecimiento de poblaciones linfocitarias esplénicas

Una serie de experiencias previas estuvieron destinadas a evaluar la eficacia de los métodos de enriquecimiento descritos en los puntos 3.7. y 3.10.

Con el fin de estandarizar las condiciones experimentales a ser empleadas en los ensayos de transferencia se procedió a cuantificar el porcentaje de células T y B presentes en el bazo de los animales sensibilizados con virus y su modificación como resultado del tratamiento "in vitro" con suero anti-theta.

Como se observa en la Tabla XVII el porcentaje de linfocitos B y T presente en las suspensiones de células esplénicas provenientes de animales sensibilizados (45,7% y 26,3% respectivamente), no difirió del hallado en las suspensiones de los bazos

Tabla XVII: Cuantificación de poblaciones linfocitarias en células esplénicas de animales sensibilizados\*.

Tratamiento con suero anti-theta	Sueros	Antisueros	Células fluorescentes	Células totales	% fluorescentes
-	conejo normal	cabra anti-conejo	12	205	5,8
	anti Ig ratón (conejo)	Idem	70	153	45,7
-	anti $\theta$ (conejo)	Idem	65	247	26,3
+	anti Ig ratón (conejo)	Idem	218	235	92,7

\* Se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta, como se describe en el punto 3.7.4., teniendo suspensiones de células de bazo de ratones Balb/c de 45 días de vida, inoculados con 5 dosis de  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ cada una, separadas por 7 días de intervalo y sacrificadas 9 días después de la última inoculación.

provenientes de animales normales de la misma edad, como se demuestra en las Figuras 15 y 16 del punto 4.2.3. (51,7% y 25,5% respectivamente). Luego del tratamiento con suero anti-theta en presencia de complemento se observó un enriquecimiento de linfocitos B (92,77%) detectados por la técnica de IFI indicando la ausencia casi total de linfocitos T.

#### 4.4.2.2. Ensayos de transferencia pasiva celular a ratones infectados e inmunosuprimidos

En tres experiencias sucesivas un total de 114 ratones de 45 días de vida, fueron infectados y tratados con 50 mg/kg de Cy los días -1,+1,+4,+6 y divididos en 4 grupos experimentales.

El grupo I (Cy + V + CST) constituido por 30 animales recibió por vía ip 7 días después de la infección viral  $80 \times 10^6$  células esplénicas totales procedentes de animales dadores inoculados con 5 dosis de VJ como se describió en el punto 3.10.2.

El grupo II (Cy + V + CS $\theta$ ) constituido por otros 30 ratones fue inoculado por la misma vía con un número equivalente de células inmunes previamente tratadas con suero anti-theta.

El tercer grupo (Cy + V + CN) 24 animales recibieron  $80 \times 10^6$  células esplénicas normales.

El cuarto grupo (Cy + V) permaneció sin transferir y se utilizó como control.

Como en el caso de la transferencia de anticuerpos, los

animales fueron observados diariamente registrándose morbimortalidad hasta los 35 días pi.

Un lote de 24 animales (grupo V) infectado constituyó el control virus.

En los animales del grupo I, infectados y tratados con Cy que recibieron transferencia de células inmunes totales, se registró una mortalidad del 70,0% mientras que en los que recibieron células inmunes previamente tratadas con suero anti-theta (Cy + V + CSØ) la mortalidad fue del 90,0%.

Los controles infectados e inmunosuprimidos sin transferencia celular mostraron una mortalidad del 100%, mientras que en los que recibieron células normales la mortalidad fue del 87,5%.

Los datos obtenidos figuran en la Tabla XVIII.

#### 4.4.2.3. Efecto de la transferencia celular sobre el contenido de virus en cerebro

Con el fin de determinar si las células esplénicas transferidas previamente de animales dadores que recibieron 5 inoculaciones semanales de  $5 \times 10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ip, eran capaces de disminuir o eliminar el título de virus en el SNC de los animales infectados e inmunosuprimidos se procedió en uno de los experimentos descritos en el punto anterior, a tomar muestras

Tabla XVIII: Porcentaje de mortalidad acumulativa en ratones Balb/c infectados, inmunosuprimidos y transferidos con células esplénicas inmunes y sus controles.

M O R T A L I D A D %					
Días pi	Grupo I <sup>(1)</sup> (Cy+V+CST) 30 animales	Grupo II <sup>(2)</sup> (Cy+V+CSθ) 30 animales	Grupo III <sup>(3)</sup> (Cy+V+CN) 24 animales	Grupo IV <sup>(4)</sup> (Cy+V) 30 animales	Grupo V <sup>(5)</sup> (V) 24 animales
12	-	-	12,5	-	-
13	-	-	25	-	-
14	30	20	62,5	20	-
15	70	60	-	30	-
16	-	-	75	70	-
17	-	90	87,5	100	-
18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
Mortalidad final %	70	90,0	87,5	100	0

(1) Animales de 45 días de vida infectados en el día 0 con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic inmunosuprimidos con Cy los días -1 +1 +4 +6 e inoculados con  $80 \times 10^6$  células esplénicas totales.

(2) Idem anterior, recibiendo células esplénicas totales tratadas con suero anti-theta.

(3) Idem anterior pero recibieron células normales.

(4) Controles infectados e inmunosuprimidos.

(5) Controles infectados solamente.

de cerebro de ratones de los grupos I (Cy + V + CST), II (Cy + V + CSØ) y III (Cy + V).

Así, a los 8, 11 y 14 días pi, se sacrificaron 3 animales por grupo determinándose el contenido de virus en cerebro por titulación en células Vero como se describió en el punto 3.4.1.

Los resultados de estas titulaciones, que se muestran en la Tabla XIX indican que la transferencia de células totales produce la desaparición del virus alrededor del día 14 pi. Este efecto puede atribuirse a linfocitos T sensibilizados, ya que es eliminado por el tratamiento de las células esplénicas transferidas con suero anti-theta.

En el curso de los experimentos anteriores surgió la posibilidad de modificar el régimen de inmunización de los dadores, ya que si bien se sabía que el esquema de 5 inoculaciones era efectivo para producir células citotóxicas, se trataba de un esquema de sensibilización forzado para explicar el papel de células sensibilizadas en la resistencia del ratón adulto a la infección.

Por lo tanto, se pensó que, probablemente, los linfocitos esplénicos provenientes de ratones infectados por vía ic con una sola dosis de VJ fueran más apropiados para evaluar el papel de la inmunidad celular en la resistencia a la infección. Para dilu

Tabla XIX: Efecto de la transferencia de células inmunes sobre el contenido de virus en cerebro de ratones infectados y tratados con Cy.

GRUPO	Día de toma de muestra		
	8	11	14
I (Cy+V+CST) (a)	$1,5 \times 10^4$ (d)	$4 \times 10^3$	5
II (Cy+V+CS $\theta$ ) (b)	$1 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3$	$3 \times 10^3$
III (Cy+V) (c)	$2 \times 10^3$	$7 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$

(a) Animales de 45 días de vida infectados en el día 0 con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic e inmunosuprimidos con Cy los días -1 +1 +4 +6 e inoculados con  $80 \times 10^6$  células esplénicas totales provenientes de animales dadores que recibieron 5 inoculaciones semanales de  $5 \times 10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ip.

(b) Idem anterior pero recibieron células esplénicas totales tratadas con suero anti-theta.

(c) Controles infectados e inmunosuprimidos

(d) Expresado como UFP/ml



cidar este punto, se realizaron 3 experimentos sucesivos con un total de 125 ratones de 45 días de vida los que fueron infectados y tratados con 50 mg/kg de Cy en los días -1 +1 +4 +6, y divididos en 3 grupos experimentales:

- El grupo I, constituido por 40 animales, recibió en el día 0 de la infección viral células esplénicas inmunes procedentes de dadores infectados 7 días antes con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic.
- El grupo II, constituido por 42 animales, recibió células esplénicas inmunes obtenidas de la misma forma que la descrita anteriormente, pero en el día 7 de la infección viral.
- El grupo III, infectado e inmunosuprimido (43 ratones) fue utilizado como control.

En todos los grupos se registró morbimortalidad hasta los 35 días pi y se tomaron muestras de cerebro de 3 animales por grupo los días 8, 11 y 14 pi. Como en el caso anterior, el contenido de virus en cerebro fue cuantificado por titulación en células Vero.

Como puede observarse en la Tabla XX, la transferencia de células en el día 0 produce una reducción del 90% ( $8,5 \times 10^3$  PFU vs  $2,5 \times 10^2$  PFU) en el título de virus en cerebro de los animales transferidos con respecto a los controles. Sin embargo, es interesante destacar que esta reducción no va acompañada de una disminución en la mortalidad.

Tabla XX: Efecto de la transferencia de células inmunes sobre la mortalidad y el contenido de virus en cerebro de ratones infectados y tratados con Cy.

GRUPO	Día de la transferencia celular	Día de toma de muestra			Mortalidad %
		8	11	14	
I (a)	0	$1 \times 10^4$ <sup>(c)</sup>	$2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^2$	100,0 (40/40) <sup>(d)</sup>
II (a)	7	$2,5 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$	$6 \times 10^3$	100,0 (42/42)
III (b)		$8 \times 10^3$	$8 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3$	93,0 (40/43)

(a) Animales de 45 días de vida infectados ic con VJ e inmunosuprimidos con Cy, inoculados con  $80 \times 10^6$  células esplénicas totales provenientes de animales dadores que recibieron una inoculación de  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ por vía ic.

(b) Controles infectados e inmunosuprimidos.

(c) Expresado como UFP/ml.

(d) Número de animales muertos sobre el total.

## 5. DISCUSION

Los mecanismos defensivos del huésped contra las infecciones virales están basados en un conjunto de factores específicos e inespecíficos.

El poder comprender estos mecanismos, depende por un lado del conocimiento preciso de las propiedades biológicas de cada virus en particular y por otro, de los tipos de respuesta inmune que se ponen en marcha como consecuencia de la entrada del microorganismo.

Sólo cuando los parámetros básicos sobre la inmunobiología de un virus en particular son adecuadamente conocidos, es que pueden comenzar a comprenderse globalmente los mecanismos que conducen a una enfermedad viral determinada.

En las infecciones virales agudas, un desequilibrio entre la replicación viral y la respuesta inmune del huésped da origen ya sea, a la eliminación del virus del organismo, generalmente con inmunidad residual, o bien a lesiones celulares que conducen a la enfermedad. En este último caso, la injuria tisular se produce por la interacción del virus o alguno de sus antígenos con la respuesta inmune generada en el huésped.

Un virus, por ser un complejo de antígenos macromoleculares, es capaz de inducir en el huésped una gran variedad de respuestas

inmunes, dependiendo de la naturaleza estructural de cada antígeno y de la forma en que éste es presentado al sistema inmunológico del huésped.

Por otra parte, además de estimular respuestas humorales o celulares, algunas de las células del macroorganismo que el virus infecta, pueden formar parte del sistema inmune. Como resultado de ello la infección producirá eventualmente una alteración en la respuesta inmunológica que puede expresarse como aumento o falla, dependiendo de la funcionalidad y del estadio de la célula comprometida. Como consecuencia, se interferirá, ya sea la formación de anticuerpos, o bien los mecanismos efectores celulares.

Como dijimos, los virus contienen gran cantidad de proteínas antigénicas en la cápside y envoltura.

En las infecciones naturales la cantidad de virus que invade al organismo es muy pequeña y por lo tanto, si el huésped es poco susceptible a la infección puede que no se genere respuesta inmune o, a lo sumo, se detecte solamente una transitoria producción de IgM, respuesta que en general no se asocia con el establecimiento de memoria inmunológica.

Sin embargo, cuando el huésped es susceptible, la masa antigénica se incrementa debido a la replicación viral, y durante este proceso se sintetizan anticuerpos contra antígenos se superficie, internos y contra proteínas no estructurales del virión.

Los anticuerpos dirigidos contra las proteínas internas y no estructurales, carecen de importancia en la neutralización o limpieza del virus o para conferir protección contra una reinfección, sin embargo, son útiles en la identificación y en el diagnóstico de la infección viral.

El mecanismo de neutralización es generalmente el encargado de limitar la diseminación, fundamentalmente en aquellas infecciones en las que el virus es liberado al espacio extracelular por lisis de la célula huésped (111) (112) (113) (114).

En el caso de los virus que no son citolíticos "per se", sino que son liberados de las células infectadas por un proceso de brotación, el mecanismo por el cual los anticuerpos limitan la diseminación viral es más complejo. Los anticuerpos se fijan a los antígenos virales presentes en la superficie de las células infectadas y provocan su destrucción con mediación del complemento (115) (116).

Surge de lo anterior que, en el caso en que la diseminación viral se realiza por los líquidos extracelulares y por la sangre, la prevención de la diseminación depende fundamentalmente de los anticuerpos neutralizantes, en tanto que el control de la propagación intercelular, depende, en general, de mecanismos ligados a la inmunidad celular. Estos mecanismos están mediados por células linfoides de la serie T sensibilizadas contra alguno de los antí

genos virales.

Dichas células pueden ser funcionalmente linfocitos citotóxicos (Tc) que al reaccionar con el antígeno viral presente en la membrana de la célula provocan su destrucción con la consiguiente liberación de virus intracelular infeccioso, el que luego es neutralizado en presencia de anticuerpos circulantes. Es de hacer notar que en el caso de infecciones producidas por virus no citolíticos este mecanismo de limpieza viral produce el daño de células que no hubieran sido dañadas por la infección (117).

Otra subpoblación de células que pueden sensibilizarse al virus (THR) ejerce su acción, no como las anteriores por contacto directo con la célula portadora del antígeno, sino por la eliminación de linfoquinas lo que conduce a una típica reacción de hipersensibilidad retardada, tendiente a limitar la infección.

Como en el caso anterior, este mecanismo, primitivamente protector, puede conducir a severas patologías, dependiendo del órgano en el que la reacción se produce, de la intensidad de la replicación viral y por lo tanto, del número de células afectadas por la infección que se comportan como células blanco (118) (119) (120) (121).

Si bien los componentes de la respuesta inmune pueden ser estudiados independientemente "in vitro", lo más probable es que "in vivo" se produzcan simultáneamente varias o todas estas res-

puestas lo que hace más complejo y, sin duda, más interesante su estudio. Además, es conocido que, según el sistema, uno de los compartimientos de la respuesta puede predominar y ser más importante que otro, dándole a cada infección viral en un huésped dado características particulares (122) (123) (124) (125).

El método más empleado para determinar el real compromiso de cada componente inmunológico, ya sea en la resistencia o en la patología, es el de la supresión selectiva de las respuestas del huésped seguida de reconstitución.

Existen técnicas inmunosupresoras muy empleadas que comprometen la totalidad de la respuesta inmunológica como por ejemplo, la timectomía (126), irradiación (127), bursectomía (128) y el uso de animales genéticamente deficientes (129).

La administración de cantidades definidas de ciertos inmunosupresores, tales como la Cy, en momentos precisos, antes o después de la estimulación antigénica, al alterar componentes definidos de la respuesta inmune, permite diseccionar el papel de cada una de las poblaciones celulares involucradas (130) (131) (132).

Conocido, entonces, el papel de cada tipo celular en la resistencia o injuria, la reconstitución celular o humoral por transferencia pasiva confirma la responsabilidad del sistema inmune en la protección o en la patología.

Teniendo en cuenta la complejidad de las diferentes varia-

bles descritas, es sin duda razonable analizar con profundidad una infección viral dada y la respuesta inmune que ella genera.

Para estudiar los mecanismos inmunopatológicos y los factores que intervienen en la resistencia a una infección viral, en esta Tesis se eligió el modelo experimental ratón adulto-VJ.

Como ya fue descrito en la Introducción, el VJ pertenece al género Arenavirus cuyo prototipo, el de la Coriomeningitis linfocitaria (LCM) y la infección que produce en el ratón, es el ejemplo clásico de enfermedad inmunopatológica inducida por virus.

Numerosos estudios (133) (134) sobre patogenia de las infecciones virales del SNC señalan que la susceptibilidad del huésped disminuye con el aumento de la edad. Sin embargo, la inoculación ic del ratón adulto con el virus de LCM produce una enfermedad letal a los 6-7 días pi (135) (136) , mientras que la inoculación del ratón por la misma vía dentro de las 24 hs del nacimiento, no provoca enfermedad, sino que da como resultado un estado de infección persistente (137).

La explicación más aceptada de esa diferencia de comportamiento entre el ratón neonato y el adulto es que el virus, además de no ser citopático, es incapaz de estimular la respuesta inmune del ratón recién nacido debido a su relativa inmadurez inmunológica (138). En el ratón adulto, inmunológicamente competente en cambio, el virus LCM estimula una pronta y efectiva respuesta inmuno



lógica que da como resultado una patología del SNC basada en una coriomeningitis letal sin evidencia de destrucción neuronal (12) (138).

Numerosas observaciones (139) (140) realizadas por una serie de investigadores han establecido que las descripciones anteriores sobre los mecanismos patogénicos de la infección por LCM, son básicamente correctas. En particular, el modelo de inmunosupresión con Cy proveyó una técnica muy útil para estudiar la dinámica de la relación entre la replicación viral y la respuesta inmune (141). Experimentos de transferencia pasiva en este modelo permitieron establecer que la enfermedad letal inducida por el virus de LCM está mediada por linfocitos T (141) (142).

Un panorama totalmente diferente se presenta en la infección del ratón con VJ que, a su vez, es coincidente con lo que sucede, entre otros, con el virus Sindbis (143) y con el de la Estomatitis Vesicular (144).

En este caso, como ya fue señalado, el ratón lactante es altamente sensible a la infección, mientras que el adulto es resistente al virus por cualquiera de las vías empleadas (72).

Una serie de trabajos experimentales utilizando ratones timectomizados dentro de las 24 hs de vida (80) (81), o ratones tratados con suero antitimocito (76) (78) (79) o con Cy (115), descartaron el efecto citopático directo del VJ como mecanismo

de producción de enfermedad, y establecieron que la muerte del ra  
tón lactante era debida a un fenómeno inmunológico bajo dependencia  
tímica.

Sin embargo, el papel de la respuesta inmune en la resis-  
tencia del ratón adulto a la infección con VJ ha sido poco estu-  
diado. Este punto constituyó, por lo tanto, el objetivo central de  
esta Tesis.

El primer paso fue el de analizar los parámetros básicos  
de la infección del ratón adulto inoculado por vía ic con VJ.

En base a los estudios presentados aquí, pudo determinarse  
que la inoculación de  $10^3$  DL<sub>50</sub> de virus en el SNC va seguida de  
una muy baja replicación viral en el órgano de inoculación. La  
recuperación de virus a partir de las muestras de cerebro en to-  
dos los tiempos estudiados, fue negativa con las técnicas conven  
cionales de titulación y fue sólo posible detectarlo utilizando  
una técnica más sensible como es la del co-cultivo en células  
Vero.

Como surge del análisis de los datos presentados, el virus  
es liberado a sangre a partir del cerebro produciendo una fugaz  
viremia, entre los días 2 y 4 pi, y una pasajera infección y replica  
ción en células esplénicas los días 3 y 4 pi. En las muestras  
co-cultivadas, la inmunomarcación con peroxidasa permitió la de-  
tección del antígeno viral, siendo este hallazgo confirmado tam-

bién por el aislamiento viral.

Estos resultados indican que sólo un pequeño número de células alberga el virus, lo que parecería sugerir que alguna restricción impediría la replicación viral en el ratón adulto. Esto difiere totalmente de lo que sucede en el lactante infectado (72) (73).

Simultáneamente con la desaparición del virus de los órganos es posible detectar los picos máximos de respuesta inmune mediada por células. Así, los linfocitos Tc aparecen en el bazo tempranamente en el curso de la infección viral (a los 2 días pi) y alcanzan su pico máximo expresado como IC del 70% a los 6 días pi y la reacción de HR, valorada por el "swelling test" fue del 24%, también al 6° día de la infección.

En lo que se refiere a la aparición temprana de células Tc, se han descrito resultados similares en otras infecciones virales. Walker y col. (146) utilizando virus Pichindé, miembro también de los Arenavirus, demostró que luego de la inoculación ev del virus a ratones adultos de diferentes cepas, se generan células Tc también a partir del 5° día pi (IC = 15%) con un pico de actividad máxima entre los días 6-7 pi (IC = 60%). Trabajos realizados con el virus influenza (147) (148) (149) (150), pusieron también de manifiesto la existencia de células Tc virus-específicas en el bazo de ratones que habían sido infectados por vía

intranasal o ev y a semejanza de lo descrito con VJ, en este caso el pico de actividad máxima se detectó alrededor del día 6 pi.

En lo que se refiere a la cinética de las respuestas inmunes, los datos presentados en este trabajo mostraron que en el ratón adulto infectado la respuesta inmune celular precedió a la humoral, ya que recién al 8° día pi, pudo detectarse IgM con actividad fijadora de complemento en títulos 1/32, e IgG con capacidad neutralizante en títulos de 1/10. Esta última aumentó progresivamente de nivel hasta un máximo de 1/160 en el día 20, en tanto que la IgM se mantuvo en títulos constantes hasta la muestra final.

Entre los 12 y los 20 días pi pudo ponerse en evidencia en suero IgG con actividad fluorescente, la que se hizo indetectable a partir del día 25 pi.

En las distintas experiencias, un promedio general del 8% de todos los ratones inoculados por vía ic con VJ, murieron entre los 14 y 17 días pi. Ninguno de los animales, ni aún los que murieron presentaron signos clínicos de enfermedad.

Los estudios de anatomía patológica realizados por microscopía óptica con las técnicas habituales, revelaron que los ratones adultos infectados ic presentaron, a nivel del SNC, discreta vasodilatación y una leve inflamación meníngea en muestras tomadas a los 14 días pi.

Por último, para completar el estudio de las característi-

cas del ratón infectado ic con VJ, se diseñaron una serie de experiencias para valorar si la infección viral alteraba la respuesta inmune generada hacia antígenos no relacionados.

No es frecuente que las infecciones virales produzcan depresión de la respuesta inmunológica. Un efecto de este tipo ha sido descrito fundamentalmente en el caso de virus tumorales (151) (152) (153) (154), sin embargo, también se han observado efectos similares en las infecciones con virus no oncogénicos (155) (156) (157) y, en el caso particular del VJ, en el modelo cobayo (110).

Se diseñaron entonces experiencias tendientes a valorar la influencia de la infección sobre la respuesta de anticuerpos (CFA) y la mediada por células (HR). Los resultados muestran que en nuestro modelo, los valores de CFA y HR obtenidos en animales inmunizados con GRC e infectados ya sea 1 ó 5 días después de la estimulación antigénica fueron similares a los de sus respectivos controles sin infectar. Las variaciones observadas en los valores absolutos pueden considerarse dentro de las aceptables para las técnicas empleadas. Esto parece indicar que, a diferencia de lo que sucede en el cobayo, la infección del ratón adulto con VJ no altera su respuesta inmune hacia antígenos no relacionados.

Una vez establecidos los parámetros básicos de la infección, se diseñaron experiencias para tratar de determinar la particion,

pación de la respuesta inmune en la susceptibilidad o resistencia al virus.

La resistencia de un animal a la infección experimental por un virus determinado ha sido atribuida a una serie de factores inherentes ya sea al virus o al huésped.

Uno de los ejemplos mejor estudiados en lo que se refiere a la resistencia ligada a la edad, es el de la infección del ratón con el virus de la Estomatitis Vesicular. En este caso, solamente ratones de corta edad, inoculados por vía ic o intranasal, desarrollan una encefalitis fatal, mientras que el ratón adulto infectado por la misma vía y con la misma dosis es resistente (144).

Se han postulado una serie de causas para explicar esta resistencia. Una de ellas es la rápida aparición en el curso de la replicación viral de gran cantidad de partículas defectivas interferentes, otra, la producción de mutantes termosensibles incapaces de multiplicarse a la temperatura corporal, el desarrollo de infecciones persistentes inaparentes o bien la precoz inactivación del virus por mecanismos específicos defensivos del huésped (158) (159) (160) (161) (162).

La infección del ratón por Rotavirus es otro de los ejemplos de susceptibilidad solamente de los animales lactantes, atribuida en este caso, a la maduración de las células epiteliales del intestino que se produce con el aumento de la edad lleva apareja-

da la consiguiente pérdida de los receptores específicos para el virus y por lo tanto la incapacidad de replicación (163) (164) (165).

Cuando la respuesta inmune es la responsable de la patología que se desarrolla como consecuencia de la infección, la explicación más empleada de la baja susceptibilidad de los animales recién nacidos, es que la inmadurez inmunológica de estos animales los hace incapaces de montar la respuesta inmune responsable de la enfermedad y muerte. Esta supuesta inmadurez inmune es uno de los factores invocados para explicar la poca sensibilidad del ratón al virus de la LCM.

Del análisis global de los resultados presentados sobre las características que presenta la infección del ratón adulto con VJ, a pesar de la baja mortalidad, creemos que pueden descartarse aquellos mecanismos que presuponen falta de infectividad ya que, como lo demuestra la presencia de virus en órganos y la concomitante respuesta inmune, hay que aceptar que el virus se ha multiplicado a un nivel por lo menos suficiente para estimular el aparato inmunocompetente. Lo que sí se hace evidente, es que este modelo experimental difiere en su comportamiento de otros Arenavirus.

En base a estos hallazgos, resultó de interés determinar si en el caso del VJ, los mecanismos inmunológicos defensivos que pu

dieran generarse tenían participación en la resistencia del ratón adulto a la infección.

Es conocido que el empleo de drogas inmunosupresoras provee una herramienta muy útil para valorar la intervención de los mecanismos inmunes en las enfermedades infecciosas. De ellas, la más estudiada ha sido la Cy que plantea, no obstante, problemas en cuanto a dosis, ritmo y vía de inoculación para obtener un efecto determinado.

En los esquemas más tradicionales, se utiliza esta droga antes de la estimulación antigénica (166) (167) (168), lo que coincide con los trabajos de Berenbaum (19) que afirman que la Cy es mucho más efectiva como agente inmunosupresor cuando se la administra previa al antígeno. Sin embargo, esto no se cumple para todos los modelos experimentales en los que se utilizan diferentes agentes infecciosos como antígeno (169) (132).

En nuestros estudios, en una primera etapa, se hizo necesario hacer ensayos sobre la toxicidad de la droga utilizando diversos ritmos y dosis de administración para obtener los resultados deseados.

La Cy fue elegida como agente inmunosupresor ya que se conocía su efecto sobre los linfocitos B y sobre poblaciones T supresoras, ejerciendo por lo tanto una acción moduladora de la respuesta inmune. (25) (28) (29) (30).

Estudiando la toxicidad de la droga en el ratón adulto en



tre 45/50 días de vida, pudimos demostrar que administrada en dosis únicas desde 200 a 400 mg/kg de peso, presentó diferentes grados de toxicidad (entre 19,2 y 85,0%). Sin embargo, fraccionando los 200 mg/kg, en cuatro dosis de 50 mg/kg de peso separadas cada una por 2 días de intervalo, se eliminó totalmente la toxicidad. En consecuencia, los experimentos en ratón adulto infectado se prosiguieron utilizando dosis únicas no tóxicas de 50, 100 ó 200 mg/kg de peso, o bien con dosis fraccionadas.

Los estudios sobre el curso de la infección viral se iniciaron determinando el efecto de la inmunosupresión, valorándose la mortalidad obtenida en los ratones infectados e inmunosuprimidos con sus controles sin tratamiento.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que la Cy en dosis únicas es capaz de alterar la resistencia del ratón adulto cuando es administrada a los 4 días pi, es decir, en momentos precisos después de la infección. Este efecto fue dosis dependiente, ya que con 200 mg/kg se alcanzó una mortalidad del 85,0%, con 100 mg/kg 70.0% y con 50 mg/kg solamente 11,1% de mortalidad. (Tabla VIII).

También se demostró que al fraccionar la dosis de 200 mg, administrándola en 2 dosis de 100 mg cada una los días -1 y +1 o bien, en cuatro dosis de 50 mg cada una los días -1, +1, +4 y +6, siendo 0 el día de la infección, se obtenía 63,6% y 96,5% de mortalidad respectivamente (Tabla X). Estos resultados demostraron que

el máximo efecto de la droga sobre la resistencia del ratón se consiguió cuando el inmunosupresor fue administrado durante un período prolongado y en momentos precisos con respecto a la estimulación antigénica, en este caso, la infección con VJ.

Dado lo novedoso del esquema empleado, se planteó la necesidad de conocer el efecto que este particular ritmo de inmunosupresión ejercía sobre la totalidad de la respuesta inmune, que justificase la reversión de la resistencia del ratón al virus.

Se eligió para relizar este estudio los GRC por ser un antígeno no replicante capaz de producir una buena respuesta inmune tanto humoral como celular y susceptibles ambas de ser cuantificadas con precisión.

Los resultados obtenidos demostraron el marcado efecto inmunosupresor del esquema empleado sobre el número de células esplénicas formadoras de anticuerpos, las que, de un valor normal de  $5.151 \pm 853$  CFA/ $10^7$  células esplénicas, descendió sostenidamente a lo largo de la administración de las cuatro dosis de droga, con valores de  $1.878 \pm 179$  con la primera dosis,  $1.203 \pm 153$  con la segunda,  $64 \pm 13$  con la tercera, hasta llegar a menos de  $10$  CFA/ $10^7$  células esplénicas con la cuarta dosis de droga. Este último valor es en un todo semejante al obtenido como basal en el bazo de ratones sin estimulación antigénica con GRC.

Estos hallazgos demostraron que la presencia de concentra

ciones relativamente constantes de Cy durante el curso de la respuesta inmune son altamente efectivas para influenciar el desarrollo de las CFA.

Por el contrario, el efecto de la Cy sobre la inmunidad mediada por células fue variable según el momento de su administración ya que, si bien se registró un sostenido aumento de la reacción de HR, medida como "swelling" luego de las tres primeras dosis de Cy, es decir, hasta el día +4 de la estimulación, cuando se aplicó la cuarta dosis en el día +6, se observó un brusco descenso en los valores de HR sugiriendo que la Cy abolió la funcionalidad del linfocito efector de la reacción. Así, el valor de  $1,10 \pm 0,28\%$  que presentaban los animales controles inoculados con  $10^8$  GRC, se transformó en  $21,35 \pm 3,25\%$  luego de la inoculación de las tres primeras dosis de Cy. Como resultado de la cuarta dosis de droga en el día +6, el valor descendió a  $7,96 \pm 1,26\%$ .

Tomando en conjunto el efecto global del esquema inmunosupresor empleado, puede afirmarse que la respuesta mediada por anticuerpos es prácticamente eliminada, en tanto que la inmunidad celular se ve potenciada en la etapa temprana de la respuesta para luego ser parcialmente suprimida con la última inoculación de droga el día +6, después de la estimulación antigénica.

Esto demuestra que en lo que se refiere a la HR el momento de inoculación de Cy con respecto al antígeno es crítico para ob

tener una determinada modificación de la respuesta inmune, ya que según surge de la Tabla XIII, la administración tardía de una única dosis de droga (50 ó 200 mg/kg) en el día +6, da como resultado una marcada disminución de la respuesta celular, es decir que la caída de la HR en el esquema fraccionado -1,+1,+4 y +6 se debe esencialmente a la última inoculación en el día +6 y no a un efecto acumulativo de la droga.

La primera, y probablemente la segunda inoculación de Cy (-1 y +1) parecerían actuar sobre la precursora de las T supresoras y sobre las T supresoras antígeno activadas. Esta cantidad de droga no parece llegar a afectar otros tipos celulares, como los linfocitos T responsables de la HR, desde el momento que se aprecia un moderado aumento de la reacción.

Esta suposición queda avalada por los hallazgos de otros autores que, en experiencias administrando bajas dosis de Cy (20 mg/kg) el día -1 ó -2, observaron un significativo aumento de los niveles de HR con respecto a los grupos controles (30) (170).

La tercera inoculación de 50 mg/kg de Cy en el día +4 produjo un importante incremento en los niveles de HR, probablemente por acción sobre otra subpoblación de linfocitos T también supresores de la reacción de HR. A este respecto, Mackanes y col (27) sugirieron que alrededor del 4° día de la sensibilización se activa un mecanismo supresor, cuya existencia demostró mediante ex

perimentos de transferencia celular.

En nuestro esquema de dosis fraccionadas, cuando se administra la cuarta dosis de Cy en el día +6, los niveles de HR disminuyen marcadamente. Esta caída abrupta de la reacción, podría deberse a que el esquema empleado de Cy no sólo afecta la subpoblación de linfocitos T supresores, sino también a la subpoblación de linfocitos T efectores de la HR.

Los datos anteriores complementan el análisis de la acción producida sobre la respuesta inmune por el particular esquema de Cy empleado, el que en nuestras manos produjo una mortalidad del ratón adulto infectado con VJ de alrededor del 100%.

Podía suponerse que el mecanismo de la Cy sobre la respuesta inmune generada por la infección viral debía ser similar al descrito empleando GRC. El estudio de los anticuerpos antiviral confirmó lo anterior, ya que los Ac Nt fueron detectados, en bajos niveles, recién a los 9 días después de concluido el tratamiento inmunosupresor, es decir, tardíamente con respecto a los controles. Este hecho puede correlacionarse directamente con la llamativa presencia de virus, normalmente indetectable, en el cerebro de los ratones adultos. Es decir, que los animales tratados con Cy al no desarrollar anticuerpos neutralizantes, carecían de la capacidad de limitar la multiplicación viral.

Como surge de los datos presentados en la Tablas XIV, XV y

XVI, trabajando con el modelo ratón adulto inmunosuprimido, donde la síntesis de anticuerpos se encuentra inhibida, la transferencia pasiva de anticuerpos específicos resultó exitosa. La mortalidad, fue significativamente disminuída dependiendo, en gran parte, de la cantidad de anticuerpos transferidos.

Como pudo ser demostrado en los experimentos de transferencia pasiva, los anticuerpos neutralizantes fueron incapaces de eliminar virus del cerebro, si bien tuvieron marcado efecto protector.

Estos hallazgos parecerían señalar que, la mortalidad observada en el ratón infectado luego de la administración de Cy, no es consecuencia directa de la activa multiplicación de virus en cerebro y por otro lado que si bien la presencia de anticuerpos es de fundamental importancia en la resistencia a la infección, el mecanismo de esta protección no está relacionado con la inhibición de la multiplicación viral.

El efecto protector de los anticuerpos, sin una necesaria "limpieza viral" no es un hecho sorprendente, ya que se conocen experiencias previas con VJ en las cuales la detección de altos títulos de virus en SNC no va acompañada de signos clínicos de enfermedad o de mortalidad (171).

El papel de la respuesta inmune en el establecimiento y/o recuperación de las infecciones virales es sin duda controvertido. Tanto la inmunidad celular como la humoral parecerían ser necesarias en el período de recuperación, pero la real participación de

cada una de ellas no está del todo establecido (123) (124) (125) (172).

En el caso de la infección con virus Influenza, algunos autores sostienen que los anticuerpos son necesarios para la recuperación de la afección pulmonar de ratones infectados (173) (174), mientras que para otros la inmunidad humoral no parecería ser trascendente (175). Sin embargo, existe gran concordancia en afirmar que los linfocitos T juegan el papel más importante en la recuperación de las infecciones pulmonares producidas en esta enfermedad (150) (176) (177).

En el caso del virus Junín se ha podido determinar en trabajos anteriores que, tanto la inmunidad pasiva natural conferida por la transmisión de anticuerpos de la madre a las crías por vía trasplacentaria o por leche, o bien inmunidad pasiva artificial, mediante la administración de suero homólogo hiperinmune a lactantes infectados, produce un acentuado descenso de la mortalidad final y un marcado retardo en el tiempo de sobrevida. Es así como, con la transferencia pasiva natural de anticuerpos se logró una sobrevida del 70% de los ratones lactantes infectados, mientras que con suero inmune homólogo la sobrevida fue del 25%. (86)

En el modelo rata, también la administración de inmunosuero específico en animales de 10 días de edad infectados con VJXJCL3, produjo una disminución de la mortalidad, retraso en el día prom

dio de muerte y disminución en la replicación de virus en cerebro (178).

Cuando se analizan los datos obtenidos referidos a la participación de la inmunidad celular en la infección ic del ratón adulto con VJ, los estudios de transferencia pasiva demostraron que, a diferencia de lo descrito para los anticuerpos, la transferencia de células esplénicas provenientes de animales sensibilizados al virus fue incapaz de revertir el efecto que el tratamiento inmunosupresor con Cy producía sobre el curso de la infección viral, ya que solamente se obtuvo un 20% de protección con la transferencia de  $80 \times 10^6$  células esplénicas provenientes de dadores inoculados con virus.

La transitoria disminución del título de virus observada en el día 14 pi en los animales transferidos pasivamente con células esplénicas, podría ser atribuido a la presencia en el bazo de linfocitos T citotóxicos.

Con respecto a este problema, estudios realizados por Blanden, demostraron la capacidad de las células inmunes de reducir el crecimiento viral en hígado y bazo de ratones infectados con virus de Ectromelia. Más aún, estos resultados sugirieron la necesidad de una estrecha cooperación entre linfocitos T inmunes y macrófagos para lograr la recuperación de la infección viral (179) (180).

En apoyo a estas experiencias, observaciones realizadas en



pacientes con deficiencias parciales del sistema inmunológico, indcaron que en aquéllos que presentaban defectos en la inmunidad timo-dependiente, pero con niveles normales de inmunoglobulinas, se registraban aumentos significativos en la morbimortalidad producida por infecciones virales (181).

Yap y col (150) trabajando con virus de Influenza, demostraron que la transferencia pasiva de células esplénicas inmunes a ratones inoculados intranasalmente con una dosis letal de virus, provocaba una reducción significativa de los niveles de virus infeccioso en pulmón y una marcada disminución en el porcentaje de mortalidad de los animales. Estos autores demostraron que las células transferidas encargadas de la limpieza viral pertenecían a la población de linfocitos T y que la protección conferida por la transferencia era debida, en parte, a la subpoblación de linfocitos Tc. Aquí también, como en nuestro caso, la respuesta inmune celular representada por los Tc, se pone en marcha antes de detectarse niveles significativos de anticuerpos específicos.

El conjunto de los datos presentados en esta Tesis proveen los elementos necesarios para poder delinear básicamente las características de la infección del ratón adulto con VJ e interpretar algunos de los mecanismos que intervienen en su resistencia al virus.

El ratón adulto infectado con VJ desarrolla un fenómeno de

HR que valorado por el método de "swelling test" los valores fluctuaron entre  $18,33 \pm 6,84$  y  $34,43 \pm 4,09$ , lo que indica un incremento del 50 y 70% con respecto a los controles (Tabla II).

El animal infectado sin tratamiento inmunosupresor no manifiesta severas lesiones histológicas a nivel del SNC, por carecer del número suficiente de células "blanco", es decir portadoras del antígeno viral.

Cuando se le administra Cy con el esquema fraccionado empleado a lo largo de esta Tesis, por un lado, se exagera la inmunidad celular, como lo demuestran los experimentos con GRC, y por otro se logra una intensa replicación viral en el cerebro la que provee a los linfocitos sensibilizados de un gran número de células "blanco". De esta forma se establecen las condiciones óptimas para que la respuesta inmune produzca las lesiones del SNC que conducen al 96,5% de mortalidad de los animales.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de inmunosupresión puede afirmarse, que en este modelo, los mecanismos de inmunidad mediada por células son esencialmente productores de patología más que protectores.

Esto quedó evidenciado por los ensayos de transferencia celular que no confirieron ninguna protección y por el hecho de que cuando se dan las condiciones necesarias para que la reacción se exprese, es decir en nuestro caso la presencia de células "blanco", se registraron en el SNC lesiones histológicamente compatibles con

una reacción de HR que condujeron a la muerte de los animales.

En este contexto, la protección que confirieron los anticuerpos específicos podría ser explicada por un fenómeno similar al denominado "enhancement" o de facilitación descrito en inmunidad tumoral (182). Es decir, los anticuerpos, al unirse al antígeno viral en la superficie de las células infectadas, interferirían con la acción de los linfocitos sensibilizados evitando de esta forma la consiguiente patología.

## 6. CONCLUSIONES

El trabajo experimental realizado a lo largo de esta Tesis ha contribuido a determinar las características básicas de la infección por VJ en el modelo ratón adulto, centrandó la atención fundamentalmente en los aspectos virológicos e inmunológicos para tratar de esclarecer los factores que contribuyen a la resistencia.

Los resultados obtenidos demuestran que en el ratón adulto infectado ic con  $10^3$  DL<sub>50</sub> de VJ:

- 1) La replicación viral es escasa ya que fue posible recuperar virus de cerebro, bazo y sangre solamente empleando técnicas de co-cultivo y durante corto período.
- 2) Sin embargo la multiplicación viral fue suficiente para desencadenar una amplia gama de respuesta inmune.
- 3) La respuesta inmunológica de base celular mediada por linfocitos citotóxicos precedió a la humoral ya que fue posible detectar células Tc en bazo a los 2 días pi con un pico de actividad máxima a los 6 días pi.
- 4) El ratón adulto infectado desarrolló un fenómeno de HR hacia el virus valorado por la técnica de "swelling test" con valores altamente significativos con respecto a los controles a partir del día 6 pi, siempre que el antígeno viral sea reconocido en el

contexto de antígeno de histocompatibilidad.

5) En lo que se refiere a la respuesta humoral, los Ac Nt y Ac Fc fueron detectados a partir de los 8 días de la infección, alcanzando un pico entre los 12-20 días pi. Los Ac Fl se mantuvieron entre los 12 a 25 días pi, con una declinación de la síntesis de anticuerpos cinco días más tarde.

Por separación en columna de Sephadex, pudo ser demostrado que los Ac Nt y Ac Fl predominan en la fracción IgG mientras que los Ac Fc en la IgM.

6) Los estudios histológicos del cerebro pusieron en evidencia un discreto proceso inflamatorio a nivel meningeo, sin detección de lesiones necróticas o hemorrágicas.

La inmunosupresión con Cy proveyó de una herramienta muy útil para valorar la intervención de los mecanismos inmunes en la resistencia a la infección.

Los estudios revelaron que la administración de droga, cuatro dosis de 50 mg/kg de peso de Cy los días -1 +1 +4 +6 considerando día 0 el de la infección viral, fue capaz de revertir la resistencia del ratón adulto a la inoculación viral.

Los estudios realizados en el animal inmunosuprimido demostraron:

1) El establecimiento de una importante replicación viral en el sitio de inoculación, es decir, cerebro.

- 2) Un marcado retraso en el momento de aparición de los anticuerpos neutralizantes.
- 3) La producción de severas lesiones a nivel cerebral.
- 4) Los estudios inmunoenzimáticos permitieron la detección de antígeno viral localizado en neuronas aisladas y/o piramidales del hipocampo.

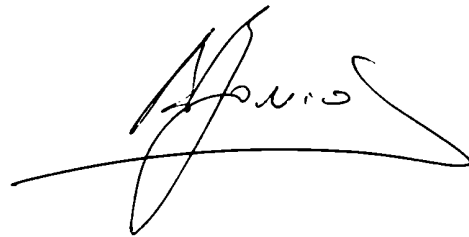
En el modelo ratón adulto infectado e inmunosuprimido, se realizaron ensayos de reconstitución destinados a determinar, la influencia que tenía la inmunidad humoral y celular sobre el curso de la infección, mediante la transferencia pasiva de anticuerpos y de células esplénicas inmunes respectivamente.

Los resultados obtenidos demostraron que:

- 1) Los anticuerpos fueron más eficaces en proteger a los animales inmunosuprimidos (70% de sobrevida) que las células inmunes (20% de sobrevida).
- 2) En ambos casos, la protección no estuvo ligada a la eliminación del virus.

Se concluye que la infección del ratón adulto con VJ va acompañada de una franca respuesta inmune específica, tanto celular como humoral. La disminución de la resistencia mediante la administración de Cy estuvo ligada a la aparición de lesiones a nivel cerebral y a marcado descenso de la respuesta humoral. La

resistencia puede ser parcialmente restablecida mediante la transferencia pasiva de anticuerpos y de células inmunes, lo que evidencia la participación de ambos mecanismos inmunes en la resistencia del ratón adulto a la infección con VJ.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping, fluid strokes that are difficult to decipher.A handwritten signature in black ink, featuring a large, prominent loop on the left side and a long, sweeping horizontal stroke extending to the right.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Jerne,N.K.1974.Towards a network theory of the immune system.  
Ann. Immunol. (Inst.Pasteur) 125:373
- 2.- Benacerraf,B.; Greene,M.I.; Sy,M-S; Dorf,M.E.1982.Suppressor T cell  
circuits.Ann.N.Y.Acad.Sci.392:300
- 3.- Boyse,E.A.; Miyazawa,M.;Aoki,T.; Old,L,J.1968.Ly-A and Ly-B:Two systems  
of lymphocyte isoantigen in the mouse.Proc.Roy.Soc. (Biol.) 170:175
- 4.- McKenzie,I.F.C.; Potter,T.1979.Murine lymphocyte surface antigens.  
Adv.Immunol. 27:179
- 5.- Salaman,M.H.1970.Immunosuppressive effects in infection.  
Proc.Roy.Soc.Med. 63:11
- 6.- Woodruff,J.F.; Woodruff,J.J.1975.T-lymphocyte interaction with viruses  
and virus-infected tissues.Prog.Med.Virol. 19:120
- 7.- Fenner,F.1968.Molecular and celular biology.En:The biology of animal  
viruses.Academic Press,New York,Vol.I
- 8.- Fenner,F.1968.The pathogenesis and ecology of viral infections.En:The  
biology of animal viruses.Academic Press,New York,Vol.II
- 9.- Bloom,B.R.1970.Biological activities of lymphocyte products.En:Mediators  
of cellular immunity (Lawrence,H.S.; Landy,M. ed.).Academic Press,New  
York,pag. 247
- 10.- Zinkernagel,R.M.; Doherty,P.C.1974.Restriction of in vitro T cell-mediated  
cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-  
allogeneic system.Nature (London) 248:701



- 11.- Rowe, W.P.; Black, P.H.; Levey, R. 1963. Protective effect of neonatal thymectomy on mouse LCM infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114:248
- 12.- Cole, G.A.; Nathanson, N.; Predergast, R.A. 1972. Requirement of  $\theta$ -bearing cells in lymphocytic choriomeningitis virus-induced central nervous system disease. Nature (London) 238:335
- 13.- Oldstone, M.B.A.; Dixon, F.J. 1970. Persistent lymphocytic choriomeningitis viral infection. J. Immunol. 104:829
- 14.- Notkins, A.L. 1971. Infections virus-antibody complexes: interaction with anti-immunoglobulins, complex and rheumatoid factor. J. Exp. Med. 134:415
- 15.- Notkins, A.L.; Mergenhagen, S.E.; Howard, R.J. 1970. Effect of virus infections on the function of the immune system. Ann. Rev. Microbiol. 24:525
- 16.- Gabrielsen, A.E.; Good, R.A. 1967. Chemical suppression of adaptive immunity. Adv. Immunol. 6:91
- 17.- Brock, N.; Hohorst, H-J. 1962. Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in Warmblüterorganismus. Naturwiss 49:610
- 18.- Brock, N.; Hohorst, H-J. 1963. Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro. Arzneimittel-Forschung 13:1021
- 19.- Berenbaum, M.C. 1979. Time-dependence and selectivity of immunosuppressive agents. Immunology 36:355
- 20.- Kerckhaert, J.A.; Hofluis, F.M.; Villers, J.M. 1977. Effect of variation in time and dose of cyclophosphamide injection on delayed hypersensitivity and antibody formation. Cell. Immunol. 29:232

- 21.- Kaufmann,S.H.E.; Hahn,H.; Diamanstein,T.1980.Relative susceptibilities of T cell subsets involved in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells to the in vitro action of 4-hydroperoxycyclophosphamide. J.Immunol. 125:1104
- 22.- Maguire,H.; Ettore,V.1965.Enhancement of dinitrochlorobenzene (DNCB) contact sensitization by cyclophosphamide in the guinea pig. J.Invest.Dermatol. 48:39
- 23.- Turk,J.L.; Poulter,L.W.1972.Selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide.Clin.Exp.Immunol. 10:285
- 24.- Turk,J.L.; Parker,D.; Poulter,L.W.1972.Functional aspects of the selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. Immunology 23:493
- 25.- Stockman,G.D.; Hein,L.R.; South,M.A.; Trentin,J.J.1978.Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartment of adult mice. J.Immunol. 110:227
- 26.- Santos,G.W.; Owens,A.H.1966.19S and 7S antibody production in the cyclophosphamide -or methotrexate- treated rat. Nature (London) 209:622
- 27.- Mackaness,G.B.; Lagrange,P.H.; Miller,T.E.; Ishibashi,T.1974.Feed-back inhibition of specifically sensitized lymphocytes. J.Exp.Med. 139:543
- 28.- Lagrange,P.H.; Mackaness,G.B.; Miller,T.E.1974.Potentiation of T cell-mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. J.Exp.Med. 139:1529

- 29.- Schwartz,A.; Askenase,P.W.; Gershon,R.K.1978.Regulation of delayed-type hypersensitivity reactions by cyclophosphamide sensitive T cells. J.Immunol. 121:1573
- 30.- Askenase,P.W.; Hayden,B.J.; Gershon,R.K.1975.Augmentation of delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide wich do not affect antibody responses. J.Exp.Med. 141:697
- 31.- Instituto de Virología de Córdoba.1966.Virus Junín en la Provincia de Córdoba.Editado por:Comisión Nacional Coordinadora para estudio y lucha contra la Fiebre Hemorrágica Argentina (Contribuciones de los Organismos Integrntes) 85
- 32.- Kravetz,F.1977.Ecología y control de reservorios.Ciencia e Investigación 33:235
- 33.- Pirotsky,I.; Zuccarini,J.; Molinelli,A.; Di Pietro,A.; Barrera Oro,J.; Martini,P.; Copello,A.1959.Virosis Hemorrágica del N.O. Bonaerense. Ministerio de Bienestar Social y Salud Pública.Capítulo 4:Epidemiología pag. 13
- 34.- Parodi,A.S.; Greenway,D.J.; Rugiero,H.R.; Rivero,E.; Frigerio,M.J.; Mettler,N.E.; Garzón,F.; Boxaca,M.C.; Guerrero,L.B.de; Nota,N.R. 1958.Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. Día Médico 30:2300
- 35.- Greenway,D.J.; Rugiero,H.R.; Parodi,A.S.; Frigerio,M.J.; Rivero,E.; de la Barrera,J.M.; Garzón,F.; Boxaca,M.C.; Mettler,N.; Guerrero,L.B. de; Nota,N.R.1959.Epidemic Hemorrhagic Fever in Argentine. Public Health Reports 74:1011

- 36.- 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. 1970.Arenaviruses:proposed name for a newly defined virus group. J.Virol. 5:651
- 37.- Rowe,W.P.; Pugh,W.E.; Webb,P.A.; Peters,C.J.1970.Serological relationship of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. J.Virol. 5:289
- 38.- Lascano,E.F.; Berría,M.I.1971.Microscopía electrónica de virus Junín en cultivos primarios de riñón de conejo y de riñón de hamster. Medicina (Bs.Aires) 31:1
- 39.- Lajmanovich,S.; Coto,C.E.; Parodi,A.S.; Gonzalez,S.1964.Ultracentrifugation and identification of the nucleic of Junin virus. Proc.7<sup>th</sup> Intern.Congress of Tropical Med. and Hyg. 3:313
- 40.- Martinez Segovia,Z.M.de; Grazioli,F.1969.The nucleic acid of Junin virus. Acta Virol. 13:264
- 41.- Martinez Segovia,Z.M.de; De Mitri,M.I.; Grau,O.; Añón,M.C.;Franze-Fernandez,M.T.1977.Estudios bioquímicos del virus Junín. Medicina (Bs.Aires) 37 supl.3:18
- 42.- Lascano,E.F.; Berría,M.I.1969.Microscopía electrónica de cultivos primarios de fibroblastos de ratón inoculados con virus Junín. Medicina (Bs.Aires) 29:487
- 43.- Tkaczewski,L.Z.; Help,G.I.; Coto,C.E.1970.Some morphological aspects related to Junin virus (A.H.F.) virus purification. Septième Congres International de Microscopie Electronique,Greoble.

- 44.- Coto,C.E.; Help,G.; Tkaczewski,L.Z.1972.Biological properties of Junin virus purified from infected mouse brain. Medicina (Bs.Aires) 32:281
- 45.- Boxaca,M.C.; Parodi,A.S.; Rugiero,H.; Blay,R.1961.Fiebre Hemorrágica experimental en cobayo. Rev.Soc.Arg.Biol. 37:170
- 46.- Guerrero,L.B.de; Boxaca,M.C.; Weissenbacher,M.C.; Frigerio,M.J.1977. Infección experimental del cobayo con virus Junín.Cuadro clínico, diseminación y eliminación del virus. Medicina (Bs.Aires) 37:271
- 47.- Carballal,G.; Laguens,R.R.; Cossio,P.M.; Cabeza Meckert,P.; Rabinovich,A.; Vazquez,C.; Maiztegui,J.I.; Arana,R.1977. Alteraciones del tejido hemopoyético del cobayo en la infección experimental con virus Junín. Medicina (Bs.Aires) 37 (supl. 3):101
- 48.- Carballal,G.; Rodriguez,M.; Frigerio,M.J.; Vazquez,C.1976.Junin virus infection of guinea pigs:Electron microscopic studies of peripheral blood and bone marrow. J.Infect.Dis. 135:367
- 49.- Elsner,B.; Boxaca,M.C.; Weissenbacher,M.C.; Guerrero,L.B.de.1976. Estudio de la infección experimental del cobayo con virus Junín. I.- Anatomía patológica. Medicina (Bs.Aires) 36:197
- 50.- Zaharzewsky,L.; Parodi,A.S.1966.Microscopía electrónica de la acción citopatológica del virus Junín en el ganglio linfático del cobayo. Medicina (Bs.Aires) 26:210
- 51.- Gonzalez,S.M.; Mejszenkier,J.D.1962.Variaciones hematológicas en los cobayos con Fiebre Hemorrágica experimental (virus Junín). Rev.Soc.Arg.Biol. 38:392

- 52.- Nota,N.R. ; Frigerio,M.J. ; Guerrero,L.B.de; Nejamkis,M.R.1969.  
Estudios hematológicos en cobayos infectados con virus Junin  
cepa XJ y cepa XJ Clon 3. Medicina (Bs.Aires) 29:171
- 53.- Molinas,F.C. ; Paz,R.A. ; Rimoldi,M.T. ; de Bracco,M.M.E.1972.  
Studies of blood coagulation and pathology in experimental infection  
of guinea pigs with Junin virus. J.Infect.Dis. 137:740
- 54.- Rabinovich,A. ; Cossio,P.M. ; Carballal,G. ; Arana,R.M.1977.  
A rapid method for detecting Junin virus in the guinea pig.  
Intervariology 8:360
- 55.- Parodi,A.S. ; Nota,N.R. ; Guerrero,L.B.de; Frigerio,M.J. ;  
Weissenbacher,M.C. ; Rey,E.1967.Inhibition of immune response in  
Experimental Hemorrhagic Fevers (Junin virus)  
Acta Virol. 2:120
- 56.- Carballal,G. ; Cossio,P.M. ; Laguens,R.R. ; Ponzinibio,C. ; Oubiña,J.R. ;  
Cabeza Meckert,P. ; Rabinovich,A. ; Arana,R.M.1981.Junin virus infection  
of guinea pigs:Immunohistochemical and ultrastructural studies of the  
hemopoietic tissue. J.Infect.Dis. 143:1
- 57.- Carballal,G. ; Oubiña,J.R. ; Rondirone,S.N. ; Elsner,B. ; Frigerio,M.J.  
1981.Cell-mediated immunity and lymphocyte populations in experimental  
Argentine Hemorrhagic Fever (Junin virus). Infect.Immu. 34:323
- 58.- Elsner,B.1977.Anatomía patológica de la Fiebre Hemorrágica Argentina.  
Medicina (Bs.Aires) 32:200
- 59.- Nejamkis,M.R. ; Nota,N.R. ; Frigerio,M.J. ; Carballal,G.1972.  
Estudios inmunológicos en Fiebre Hemorrágica Argentina experimental.  
IV.- Acción del suero antilinfocítico en la enfermedad del cobayo.  
Rev.Asoc.Arg.Micro. 4:3

- 60.- Cossio,P.M.; Laguens,R.R.; Rabinovich,A.; Carballal,G.;  
Cabeza Meckert,P.; Maiztegui,J.I.; Vazquez,C.; Arana,R.M.1977.  
Estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales del riñón de cobayo  
infectado experimentalmente con virus Junín.  
Medicina (Bs.Aires) 37:108
- 61.- Gonzalez,P.H.; Maiztegui,J.I.; Cossio,P.M.; Arana,R.; Laguens,R.P.1980.  
Lymphatic tissue in Argentine Hemorrhagic Fever.  
Arch.Pathol.Lab.Med. 104:250
- 62.- Nejamkis,M.R.; Weissenbacher,M.C.; Calello,M.A.1977.  
Infección experimental con virus Junín en la rata. Medicina (Bs.Aires)  
37:121
- 63.- Cabeza Meckert,P.; Avila,M.M.; Weissenbacher,M.C.; Nejamkis,M.R.;  
Laguens,R.P.1979.Patología del sistema nervioso central de la rata  
infectada experimentalmente con la cepa XJ de virus Junín.  
Resumen XXIV.- Reunión Científica de la Soc. Arg. de Invest. Clínica  
pag 110
- 64.- Lascano,E.F.; Avila,M.M.; Weissenbacher,M.C.1982.  
Encefalitis subaguda en ratas inoculadas con virus Junín.  
Resumen XXVI.- Reunión Científica de la Soc. Arg. de Invest. Clínica  
pag 8
- 65.- Weissenbacher,M.C.; Calello,M.A.; Colillas,O.J.; Golfera,H.;  
Rondinone,S.N.; Frigerio,M.J.1978.Infección en primates del  
Nuevo Mundo con virus Junín.V.- Alouatta caraya.  
Medicina (Bs.Aires) 38:529

- 66.- Frigerio,M.J.; Rondinone,S.N.; Laguens,R.P.; Calello,M.A.; Cabeza Meckert,P.; Colillas,O.; Weissenbacher,M.C.1982. Infección de primates del Nuevo Mundo con virus Junín. III.- Saimiri sciurens. Medicina (Bs.Aires) 42:519
- 67.- Saimolovich,S.R.; Rondinone,S.N.; Laguens,R.P.;Colillas,O.; Frigerio,M.J.; Weissenbacher,M.C.1983.Infección de primates del Nuevo Mundo con virus Junín.IV.- Aotus trivirgatus. Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 15:219
- 68.- Carballal,G.; Cossio,P.M.; Arana,M.R.; Nagle,C.; Casanova,M.B.1980. El Cebus sp como modelo experimental para la Fiebre Hemorrágica Argentina. Medicina (Bs.Aires) 40:734
- 69.- Weissenbacher,M.C.; Calello,M.A.; Rondinone,S.N.; Travi,B.; Frigerio,M.J.1980.Infección de primates del Nuevo Mundo con virus Junín.II.- Callithrix jacchus. Medicina (Bs.Aires) 40:21
- 70.- Gonzalez,P.H.; Laguens,R.P.; Frigerio,M.J.; Calello,M.A.; Weissenbacher,M.C.1983.Junin virus infection of Callithrix jacchus: Pathologic features. Am.J.Trop.Med.Hyg. 32:417
- 71.- Pirotsky,I.; Zuccarini,J.; Molinelli,A.; Di Pietro,A.; Barrera Oro,J.G.; Martini,P.; Martos,L.; D'Empaire,M.1959.Virosis hemorrágica del N.O. bonaerense (endemo-epidémica,febril,exantemática y leucopénica).IV.- Investigaciones virológicas de orden epidemiológico. Orientación Médica 8:708
- 72.- Boxaca,M.C.; Giovanniello,O.A.; Nota,N.R.; Nejamkis,M.R.; Guerrero,L.B.de; Frigerio,M.J.1973.Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junín.Cuadro clínico y susceptibilidad. Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 5:2



- 73.- Boxaca,M.C.; Guerrero,L.B.de.; Savy,V.L.1983.The occurrence of virus interferon and circulating antibodies in mice of the experimental infection with Junin virus.  
Arch.ges.Virusforsch. 40:10
- 74.- Giovanniello,O.A.; Boxaca,M.C.; Nota,N.R.; Nejamkis,M.R.1975.  
Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junín:  
Enfermedad tipo. Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 7:8
- 75.- Weissenbacher,M.C.; Guerrero,L.B.de.; Boxaca,M.C.1975.Experimental  
biology and pathogenesis of Junin virus infection in animals and  
man. Bull.Who. 52:507
- 76.- Taratuto,A.L.; Tkaczewski,L.Z.; Nota,N.R.; Nejamkis,M.R.;  
Giovanniello,O.A.1973.Junin virus encephalitis in mice:Its  
inhibition by antithymocyte serum. Arch.ges.Virusforsch. 43:173
- 77.- Lascano,E.F.; Berría,M.I.1974.Ultrastructure of Junin virus in  
mouse whole brain tissue cultures. J.Virol. 14:965
- 78.- Nota,N.R.; Frigerio,M.J.; Nejamkis,M.R.; Carballal,G.;  
Guerrero,L.B.de.1971.Acción del suero antitimocito en la Fiebre  
Hemorrágica Argentina experimental. Medicina (Bs.Aires) 31:298
- 79.- Nota,N.R.; Nejamkis,M.R.; Frigerio,M.J.; Guerrero,L.B.de.1973.  
Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junín.  
Efecto del suero antitimocito. Medicina (Bs.Aires) 33:398
- 80.- Schmuñis,G.; Weissenbacher,M.C.; Parodi,A.S.1967.Tolerance to Junin  
virus in thymectomized mice. Arch.ges.Virusforsch. 21:200

- 81.- Besuschio, S.C.; Weissenbacher, M.C.; Schmuñis, G.A. 1973.  
Different histopathological response to Arenavirus infection in thymectomized mice. Arch.ges.Virusforsch. 40:21
- 82.- Weissenbacher, M.C.; Schmuñis, G.A.; Parodi, A.S. 1969. Junin virus multiplication in thymectomized mice: Effect of thymus and immunocompetent cells grafting. Arch.ges.Virusforsch. 26:63
- 83.- Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.; Giovannello, O.A.; Celeste, F. 1977.  
Estudios de hipersensibilidad celular en la infección del ratón por virus Junín. II.- Experiencias con <sup>51</sup>Cr y suero antitheta.  
Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 9:92
- 84.- Giovannello, O.A.; Nejamkis, M.R.; Nota, N.R. 1978. Studies of cell-mediated immunity to Junin virus. Acta Virol. 22:37
- 85.- Nejamkis, M.R.; Giovannello, O.A.; Nota, N.R. 1977. Estudios de hipersensibilidad celular en la infección del ratón por virus Junín. I.- Ensayos de transferencia pasiva. Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 9:85
- 86.- Nejamkis, M.R.; Nota, N.R.; Weissenbacher, M.C.; Guerrero, L.B.de; Giovannello, O.A. 1975. Passive immunity against Junin virus in mice. Acta Virol. 19:237
- 87.- Nejamkis, M.R.; Giovannello, O.A.; Celeste, F.; Nota, N.R. 1980.  
Efecto de la ciclofosfamida y del suero antitimocito sobre la resistencia del ratón adulto al virus Junín. Medicina (Bs.Aires) 40:31
- 88.- Giovannello, O.A.; Nejamkis, M.R.; Galassi, N.V.; Nota, N.R. 1980.  
Immunosuppression in experimental Junin virus infection of mice. Intervirology 13:122

- 89.- Yasumura, Y.; Korwakita, Y. 1963. Study on SV40 virus in tissue cultures.  
Nippon Kinsho 21:1201
- 90.- Dulbecco, R.; Freeman, G. 1959. Plaque production by the Polyoma virus.  
Virology 8:396
- 91.- Lockert, R.Z.; Eagle, H. 1959. Requirements for growth of single human cells.  
Science 129:252
- 92.- Earle, W.R. 1943. Production of malignancy in vitro. The mouse fibroblast  
cultures and changes seen in the living cells.  
J. Nat. Cancer Inst. 4:165
- 93.- Macpherson, I.; Stoker, M. 1962. Polyome transformation of hamster  
cell clones - an investigation of genetic factors affecting  
cell competence. Virology 16:147
- 94.- Reed, L.Y.; Muench, H.A. 1938. A simple method of estimating fifty per cent  
end points. Am. J. Hyg. 27:493
- 95.- Giovanniello, O.A.; Weber, E.L.; Rabinovich, R.D. 1981. Un nuevo ensayo de  
placas para la cuantificación del virus Junín.  
Rev. Asoc. Arg. Micro. 13:17
- 96.- Horta-Barbosa, L.; Fuccillo, D.A.; Sever, J.L.; Zeman, W. 1969. Subacute  
sclerosing panencephalitis-isolation of Measles virus from brain biopsy.  
Nature (London) 221:974
- 97.- Gilden, D.H.; Wroblewska, Z.; Chesler, M.; Wellish, M.C.; Liof, F.C.;  
Wblinsky, J.S.; Rocke, L.B. 1976. Experimental panencephalitis induced in  
suckling mice by Parainfluenza type I (6/94) virus.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 35:269

- 98.- Carrigan,D.R.; Mc Kendall,R.R.; Kenneth,P.J.1978.CNS disease following of SSPE Measles virus from intraperitoneal inoculation of suckling hamsters.J.Med.Virol. 2:347
- 99.- Lascano,E.F.; Berría,M.I.; Candurra,N.A.1981.Diagnosis of Junin virus in cell cultures by immuno-peroxidase staining. Archives of Virology 70:79
- 100.- Clarke,D.H.; Casals,J.1958.Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with artropode borne virus. Am.J.Trop.Med.Hyg. 7:561
- 101.- Lowry,O.; Rosenbrogh,N.; Farr,A.; Randall,R.1951.Protein measurement with the folin phenol reagent.J.Biol.Chem. 193:265
- 102.- Golub,E.S.1971.Brain-associated  $\theta$  antigen:Reactivity of rabbit anti-mouse brain with mouse limphoid cells.Cell.Immunol. 2:353
- 103.- Reif,A.E.1962.Immune cytolysis of three mouse ascites tumors. J.Immunol. 89:849
- 104.- Gray,D.F.; Jennings,P.A.1955.Allergy in experimental mouse tuberculosis. Am.Rev.Tuber. 72:171
- 105.- Cunningham,A.J.1965.A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells.Nature (London) 207:1106
- 106.- Dresser,D.W.1978.Assays for immunoglobulin-secreting cells.En:Handbook of experimental immunology.D.M.Weir,Vol.2,pag 28.7
- 107.- Gel filtration.Theory and practice.Pharmacia Fine Chemicals,Sweden, July 1984,pag 7

- 108.- Tigelaar, R.E.; Asofsky, R. 1973. Synergy among lymphoid cells mediating the graft-versus-host responses. V.- Derivation by migration in lethally mediated recipients of two interacting subpopulation of thymus-derived cells from normal spleen. *J. Exp. Med.* 137:239
- 109.- Marker, O.; Volker, M. 1973. In vitro measurement of the time course of cellular immunity to LCM virus in mice. En: *Lymphocytic Choriomeningitis virus and other Arenavirus*. Lehmann-Gruber (Ed) pag 207
- 110.- Blejer, J.L.; Galassi, N.V.; Nejamkis, M.R.; Barrios, H.A.; Nota, N.R. 1981. Marcadores inmunológicos de atenuación en cobayos infectados con cepas o variantes del virus Junín. *Medicina (Bs.Aires)* 41:44
- 111.- Cowan, K.M. 1973. Antibody response to viral antigens. 1973. *Adv. Immunol.* 17:195
- 112.- Stoller, V. 1975. Immune lysis of Sindbis virus. *Virology* 66:620
- 113.- Fenner, F.J.; White, D.O. 1976. Recovery from viral infection. En: F.J. Fenner (ed) *Medical Virology*, 2nd ed. Academic Press, Inc. New York, pag 123
- 114.- McKendall, R.R.; Klassen, T.; Baringer, J. 1979. Host defences in herpes simplex infections of the nervous system: Effect of antibody on disease and viral spread. *Inf. Immun.* 23:305
- 115.- Oldstone, M.B.A.; Dixon, F.J. 1971. Acute viral infections tissue injury mediated by anti-viral antibody through a complement effectors system. *J. Immunol.* 107:1274
- 116.- Rawls, W.E.; Tompkins, W.A.F. 1975. Destruction of virus infected cells by complement. En: *Viral immunology and immunopathology*. Notkins A.L (ed). Academic Press. Inc, New York, pag 99

- 117.- Cerottini, J.C.; Brunner, K.T. 1974. Cell-mediated cytotoxicity allograft rejection and tumor immunity. *Adv. Immunol.* 18:67
- 118.- Griffin, D.E.; Johnson, R.T. 1973. Cellular immune response to viral infections: In vitro studies lymphocytes from mice infected with Sindbis virus. *Cell. Immunol.* 9:426
- 119.- Doherty, P.C.; Zinkernagel, R.M. 1974. T-cell mediated immunopathology in viral infection. *Transpl. Rev.* 19:89
- 120.- Leung, K.N.; Ada, G.L. 1980. Cell-mediated delayed-type hypersensitivity in the lungs of mice infected with an Influenza A virus. *Scand. J. Immunol.* 12:393
- 121.- Nash, H.A.; Phelan, J.; Wildy, P. 1981. Cell-mediated immunity in Herpes simplex virus infected mice. *J. Immunol.* 126:1260
- 122.- Bradish, C.J.; Fitzgeorge, R.; Titmus, D. 1980. The response of normal and athymic nude mice to infection by Togaviruses strain differentiation in active and adoptive immunization. *J. Gen. Virol.* 46:255
- 123.- St. Geme, J.W.; Prince, J.T.; Burke, B.A.; God, R.A.; Kirvit, W. 1965. Impaired cellular resistance to Herpes simplex virus in Wiskott-Aldrich syndrome. *N. Engl. J. Med.* 273:229
- 124.- Wyatt, H.V. 1973. Poliomyelitis in hypogammaglobulinemics. *J. Infect. Dis.* 128:802
- 125.- Ziegler, J.B.; Penny, R. 1975. Fatal Echo-30 virus infection and amyloidosis in x-linked hypogammaglobulinemia. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 3:347

- 126.- Aronsan,B.G. ; Janovic,B.D. ; Waksman,B.H.1962.Effect of thymectomy on "delayed" hypersensitivity reactions.Nature (London) 194:99
- 127.- Till,J.E. ; Mc Culloch,E.A.1961.A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.  
Radiat.Res. 14:213
- 128.- Click,B.1954.The thymus in immunobiology.Harpert and Row,New York, pag 348
- 129.- Kindred,B.1978.Functional activity of T-cells which differentiate from nude mouse precursors in congenic or allogeneic thymus graft.  
Immunol.Rev. 42:60
- 130.- Shand,F. ; Liew,F.Y.1980.Differential sensitivity to cyclophosphamide of helper T cells for humoral responses and suppressor T cells for delayed-type hypersensitivity.Eur.J.Immunol. 10:480
- 131.- Pang,T. ; Wong,P.Y. ; Pathmanathan,R.1982.Induction and characterization of delayed-type hypersensitivity to Dengue virus to mice.  
J.Infect.Dis. 146:235
- 132.- Selgrade,M.K. ; Daniels,M.J. ; Hu,P.C. ; Miller,F.J. ;Graham,J.A.1981. Effects of immunosuppression with cyclophosphamide on acute murine Cytomegalovirus infection and virus-augmented natural killer cell activity.Infect.Immun. 38:1046
- 133.- Weiner,L.P. ; Cole,G.A. ; Nathanson,N.1970.Experimental encephalitis following peripheral inoculation of West Nile in mice of different ages.J.Hyg.Cam. 68:435

- 134.- Johnson,R.T.; Mc Farland,H.F.; Levy,S.E.1972.Age-dependent resistance to viral encephalitis:Studies of infections due to Sindbis in mice. J.Infect.Dis. 125:257
- 135.- Lillie,R.D.; Armstrong,C.1945.Pathology of Lymphocytic Choriomeningitis in mice.Arch.Path. 40:141
- 136.- Lehmann-Grube,F.1971.Lymphocytic Choriomeningitis virus. Virology Monographs 10:1
- 137.- Oldstone,M.B.A.; Dixon,F.J.1970.Pathogenesis of chronic disease associated with persistent Lymphocytic Choriomeningitis viral infection. II.- Relationship of the anti-lymphocyte choriomeningitis immune response to tissue injury in chronic Lymphocytic Choriomeningitis disease.J.Exp.Med. 131:1
- 138.- Nathanson,N.; Monjar,A.A.; Panitch,H.S.; Johnson,E.D.; Petersson,G.; Cole,G.A.1975.Virus-induced cell-mediated immunopathological disease. En:Viral immunology and immunopathology.Academic Press,New York,pag 357
- 139.- Marker,O.; Volkert,M.1973.Studies on cell-mediated immunity in Lymphocytic Choriomeningitis virus in mice.J.Exp.Med. 137:1511
- 140.- Zinkernagel,R.M.; Doherty,P.C.1973.Cytotoxic thymus-derived lymphocytes in cerebro-spinal fluid of mice with Lymphocyte Choriomeningitis. J.Exp.Med. 138:1266
- 141.- Gilden,D.H.; Cole,G.A.; Monjar,A.A.; Nathanson,N.1972.Immunopathogenesis of acute central nervous system disease produced by Lymphocytic Choriomeningitis virus.I.- Cyclophosphamide-mediated induction of the virus-carrier state in adult mice.J.Exp.Med. 135:860



- 142.- Doherty,P.C.; Zinkernagel,R.M.1975.Capacity of sensitized thymus-derived lymphocytes to induce fatal Lymphocytic Choriomeningitis is restricted by the H-2 gene complex.J.Immunol. 114:30
- 143.- Park.M.M.; Griffin,D.E.; Johnson,R.T.1981.Studies of immune responses during recovery from Sindbis virus encephalitis in selectively reconstituted,thymectomized,lethally irradiated mice. Infect.Immun. 34:306
- 144.- Hecht,T.T.; Paul,W.E.1981.Replication of Vesicular Stomatitis virus in mouse spleen cells.Infect.Immun. 32:1014
- 145.- Giovanniello,O.A.; Barrios,H.A.; Rondinone,S.N.; Lascano,E.F.; Nota,N.R.1983.Self destructive DTH response in Junin-virus infected newborn mice.Comunicaciones Biológicas 1:259
- 146.- Walker,C.M.; Rawls,W.E.; Rosenthal,K.L.1984.Generation of memory cell-mediated responses after secondary infection of mice with Pichinde virus.J.Immunol. 132:469
- 147.- Eifros,R.B.; Doherty,P.C.; Gerhard,W.; Bennik,J.1977.Generation of both cross-reactive and virus-specific T-cell populations after immunization with serologically distinct Influenza A viruses. J.Exp.Med. 145:557
- 148.- Braciale,T.J.1977.Immunologic recognition of Influenza virus-infected cells.I.- Generation of virus-strain specific and cross-reactive subpopulation of cytotoxic T cells in the response to type Influenza A viruses of different subtypes.Cell.Immun. 33:423
- 149.- Zweerink,H.J.; Courtneidge,S.A.; Shehel,J.J.; Crupton,N.J.; Askonas,B.A. 1977.Cytotoxic T cells kill Influenza virus infected cells but do not distinguish between serologically distinct type A viruses. Nature (London) 267:354

- 150.- Yap,K.L.; Ada,G.L.1978.Transfer of specific T lymphocytes protects mice inoculated with Influenza virus.Nature(London) 273:238
- 151.- Salaman,M.H.1969.Immunodepression by viruses.  
Antibiotica et Chemotherapia 15:393
- 152.- Blair,P.B.; Kripe,M.L.; Lappé,M.A.; Bohag,R.S.; Young,L.1971.  
Immunologic deficiency associated with mammary tumor virus (MTV) infection in mice:Hemagglutinin response and allograf survival.  
J.Immunol. 106:364
- 153.- Bro-Jorgensen,K.; Volkert,M.1974.Defects in the immune system of mice infected with Lymphocytic Choriomeningitis virus.  
Infect.Immun. 9:605
- 154.- Woodruff,J.F.; Woodruff,J.J.1975.The effect of viral infections on the function of the immune system.En:Viral immunology and immunopathology. Notkins,A.L. (ed) .Academic.Press,New York,pag 393
- 155.- Osborn,J.E.; Blazkovec,A.A.; Walker,D.L.1968.  
Immunosuppression during acute murine Cytomegalovirus infection.  
J.Immunol 100:835
- 156.- Fireman,P.; Friday,G.;Kumate,J.1969.Effect of Measles vaccine on immunologic responsiveness.Pediatrics 43:264
- 157.- Kupers,T.A.; Petrich,J.M.; Holloway,A.W.; St.Gene,J.W.1970.  
Depression of tuberculin delayed hypersensitivity by live attenuated Mumps virus.J.Pediat. 76:716
- 158.- Huang,A.S.; Baltimore,D.1977.Defective interfering animal viruses.  
En:Comprehensive virology.Fraenkel-Cowrat,H.; Wagner,R.R. (ed).Plenum Publishing Corp.,New York,pag 73

- 159.- Kang,C.Y.; Glimp,T.; Allen,R,1978.Host cell function dependent induction of defective interfering of Vesicular Stomatitis virus En: Negative strand viruses and the host cell.Maly,B.W.; Barry,R.A. (ed) Academic Press, Inc.,New York,pag 501
- 160.- Reichmann,M.E.; Schnitzlein,W.M.1979.Defective interfering particles of Rhabdoviruses.Curr.Top.Microbiol.Immunol. 86:123
- 161.- Smith,H.1977.Host and tissue specificities in virus infection of animals.En:Virus infection and the cell surface.Cell surface reviews. Poste,G.; Nicolson,G.L. (ed).North-Holland Publishing Co.,New York Vol 2 pag 1
- 162.- Younger,J.S.; Preble,O.T.; Jones,E.V.; Creager,R.S.1978.Evolution of virus populations in persistent infections of L cells with Vesicular Stomatitis virus.En:Persistent viruses.Stevens,J.G.; Todaro,G.J.; Fox,C.F. (ed).Academic Press,Inc.New York,pag 417
- 163.- Wolf,J.L.; Cukor,G.; Blacklow,N.R.; Danbravskas,R; Trier,J.S.1981. Susceptibility of mice to Rotavirus infections:Effects of age and administration of corticosteroides.Infect.Immun. 33:565
- 164.- Riepenhoff-Talty,M.; Lee,P.C.; Comody,P.J.; Barrett,H.J.; Ogra,P.L. 1982.Age dependent Rotavirus enterocyte interactions. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 170:146
- 165.- Sheridan,J.F.; Eydellath,R.S.; Vonderfecht,S.L.; Aurelian,L.1983. Virus-specific immunity in neonatal and adult mouse Rotavirus infection.Infect.Immun. 39:917
- 166.- Glaser,M.1979.Regulation of specific cell-mediated cytotoxic response against SV40-induced tumor associated antigens by depletion of suppressor T cell with cyclophosphamide in mice.J.Exp.Med. 149:774

- 167.- Griffin,D.E.; Johnson,R.T.1977.Role of the immune response in recovery from Sindbis virus encephalitis in mice.J.Immunol. 118:1070
- 168.- Johnson,R.A.; Prince,G.A.; Suffin,S.C.; Hoswood,R.L.; Chanock,R.M. 1982.Respiratory Syncytial virus infection in cyclophosphamide-treated cotton rats.Infect.Immun. 17:369
- 169.- Mokhtarian,F.; Shah,K.1980.Role of antibody response in recovery from K-Papovavirus infection in mice.Infect.Immun 29:1169
- 170.- Gill,H.K.; Liew,F.Y.1978.Regulation of delayed-type hypersensitivity. III.- Effect of cyclophosphamide on the suppressor cells for delayed-type hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. Eur.J.Immunol. 8:172
- 171.- Blejer,J.L.; Galassi,N.V.; Saavedra,V.M.; Nejamkis,M.R.1984. Protection conferred against Junin virus infection rats. Intervirology 21:174
- 172.- Bradish,C.J.; Fitzgeorge,R.; Titmus,D.1980.The response of normal and athimic nude mice to infection by Togavirus:Strain differentiation in active and adoptive immunization.J.Gen.Virol. 46:255
- 173.- Virelizier,J.C.1975.Host defences against Influenza virus:The role of anti-haemagglutinin antibody.J.Immunol. 115:434
- 174.- Ramphal,R.; Cogliano,R.C.; Shands,J.W.; Small,P.A.1979.Serum antibody prevents lethal murine Influenza pneumonitis but not tracheitis. Infect.Immun. 25:992
- 175.- Wells,M.; Eunis,F.; Albrecht,P.1981.Recovery from a virus respiratory infection.II.- Passive transfer of immune spleen cells mice with Influenza pneumonic.J.Immunol. 126:1042

- 176.- Suziki,F.; Ohya,J.; Ishida,N.1974.Effect of antilymphocyte serum on Influenza virus infection in mice.Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 146:78
- 177.- Sullivan,J.L.; Mayer,R.E.; Barry,D.W.; Ennis,F.A.1976.Influenza virus infection in nude mice.J.Infect.Dis. 133:91
- 178.- Avila,M.M.; Sangiorgio,P.; Weissenbacher,M.C.1982.Efecto del tratamiento con inmunosuero en ratas infectadas con virus Junfn. Medicina (Bs.Aires) 42:333
- 179.- Blanden,R.V.1971.Mechanisms of recovery from a generalized viral infection:Mousepox.II.- Passive transfer of recovery mechanisms with immune lymphoid cells.J.Exp.Med. 133:1074
- 180.- Blanden,R.V.1971.Mechanisms of recovery from a generalized viral infection:Mousepox.III.- Regression of infectious foci. J.Exp.Med. 133:1090
- 181.- Fulginiti,V.A.; Kempe,C.H.; Hathway,W.E.; Robinson,A.1968.Progressive vaccinia in immunologically deficient individuals.En:Immunologic deficiency diseases of man.The National Foundation,pag 129
- 182.- Feldman,J.D.1972.Immunological enhancement:A study of blocking antibodies.Adv.Immunol. 15:167