

Tesis de Posgrado

Caracterización bioquímica de la sangre de *Calomys musculinus* infectados experimentalmente con virus Junin, en las fases aguda y persistente

Steyerthal, Noemí Lucía

1992

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

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

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

Cita tipo APA:

Steyerthal, Noemí Lucía. (1992). Caracterización bioquímica de la sangre de *Calomys musculinus* infectados experimentalmente con virus Junin, en las fases aguda y persistente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2533_Steyerthal.pdf

Cita tipo Chicago:

Steyerthal, Noemí Lucía. "Caracterización bioquímica de la sangre de *Calomys musculinus* infectados experimentalmente con virus Junin, en las fases aguda y persistente". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2533_Steyerthal.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"Caracterización bioquímica de la sangre de *Calomys musculinus*
infectados experimentalmente con virus Junin, en las fases
aguda y persistente".

Noemí Lucía Steyerthal

Tesis.
2533
ej. 2

Tesis para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"Caracterización bioquímica de la sangre de *Calomys musculinus*
infectados experimentalmente con virus Junin, en las fases
aguda y persistente".

Autor Lic. Noemí L. Steyerthal

Director: Dra. Celia E. Coto

Lugar de trabajo: Cátedras de Virología y de Análisis Bioló-
gicos. Departamento de Química Biológica.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
UBA.

Tesis para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

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

Al Dr. Juan M. Castagnino, consejero de estudios.

A la Dra. Elsa Damonte por su aporte crítico y creativo.

Al Dr. Jorge S. Lampuri por su colaboración en la ejecución e interpretación de los resultados hallados en el aislamiento y titulación de virus Junin a partir de cerebros de *Calomys musculinus* infectados.

A la Dra. Ana Haedo por los comentarios y el asesoramiento estadístico y al Lic. Roberto Fiadone por el procesamiento de datos.

A los Dres. Lucía Kordich y Osvaldo Gioseffi por sus valiosas sugerencias en la realización del estudio hematológico.

A mis compañeros: Luis Scolaro, Nélide Candurra, Susana Mersich, Felix Coulombié, Mónica Wachsmann, Laura Alché, Alcira Nesse, Ana Lauricella, Graciela Garbossa, Beatriz Sasseti, Félix Roisman, Maria Cristina Romero, Irene Quintana, Noemí Zanaro, Cristina Dubosq de quienes siempre recibí aliento y comprensión.

A todo el personal profesional y técnico del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que hicieron posible la realización de esta investigación.

ABREVIATURAS

ARN: ácido ribonucleico
ARN-m: Acido ribonucleico mensajero
C.musculus: *Calomys musculus*
CPR: proteina C reactiva
CRBN: cerebro de ratón blanco lactante normal
DL₅₀: dosis letal 50 %
dpi: días post infección
FHA: Fiebre Hemorrágica Argentina
FHB: Fiebre Hemorrágica Boliviana
GP₁: glicoproteina de envoltura 1
GP₂: glicoproteina de envoltura 2
GPC: precursor glicosilado de las proteínas de envoltura
ic: intra cerebral
IL₁: interleukina - 1
im: intra muscular
in: intra nasal
ip: intra peritoneal
KDa: kilodalton
L: replicasa - transcriptasa
LCMV: virus de la coriomeningitis linfocitaria del ratón
L/N: linfocitos/neutrófilos
MEM: medio esencial mínimo
NP: nucleoproteina
SAA: proteina sérica amiloide
SAP: proteina sérica amiloide P
SNC: sistema nervioso central
TEMED: N,N,N',N', tetrametil - 1:2 diamino etano
TRIS: tris (hidroximetil) aminometano
TTPC: tiempo de tromboplastina parcial con caolín
UFP: unidades formadoras de placas
VIII:Ag: factor VIII, actividad antigénica
VIII:C: factor VIII, actividad coagulante
VJ: virus Junin
Z: proteina con estructura de "zinc-finger"

INDICE

		<u>Pág.</u>
1	Introducción.	1
1.1.	Fiebre Hemorrágica Argentina. La enfermedad.	2
1.1.1.	Descripción clínica y hallazgos anatómo- patológicos de la FHA.	3
1.2.	Virus Junin. El agente etiológico.	8
1.2.1.	Familia Arenaviridae.	8
1.2.2.	Características de los arenavirus.	9
1.2.3.	Cepa de virus Junin.	11
1.3.	Reservorios del virus Junin y otros arenavirus.	14
1.3.1.	Estudios realizados en colonias de cricétidos..	17
1.4.	Infección experimental del <i>Calomys musculinus</i> con VJ.	18
1.4.1.	Estudios realizados utilizando la cepa XJCl ₃ .	18
1.4.2.	Infección del <i>C.musculinus</i> con la cepa Cba An 9446 del virus Junin.	20
2.	Objetivos.	23
3.	Materiales y Métodos.	25
3.1.	Virus.	26
3.2.	Cultivo de tejidos.	26
3.3.	Animales.	26
3.3.1.	<i>Calomys musculinus</i> .	26
3.3.2.	Ratones blancos.	27
3.3.3.	Conejos New Zeland White.	27
3.4.	Preparación de los stocks de virus Junin.	27
3.5.	Aislamiento y titulación de virus.	27
3.5.a.	Unidades formadoras de placa bajo agar.	27
3.5.b.	Dilución al punto final.	28
3.6.	Obtención de muestras de sangre.	28
3.7.	Determinaciones hematológicas.	29
3.8.	Determinaciones de glucemias y uremias.	29
3.9.	Determinaciones de proteínas séricas totales.	29
3.10.	Fraccionamiento de proteínas séricas.	30
3.10.a.	En acetato de celulosa gelificado.	30
3.10.b.	En gel de poliacrilamida en placa vertical.	30
3.10.c.	En dos pasos sucesivos : 1) acetato de celulosa 2) gel de poliacrilamida.	31

	<u>Pág.</u>	
3.11.	Obtención de antisueros: suero de conejo, antisuero de <i>Calomys musculinus</i>	32
3.11.a.	Método usado para la precipitación del suero de <i>Calomys musculinus</i> con sulfato de amonio.	32
3.11.b.	Preparación del inóculo.	34
3.11.c.	Esquema de la inoculación realizada.	34
3.12.	Inmunolectroforesis en gel de agar.	34
3.13.	Diseño experimental.	35
3.14.	Métodos estadísticos.	38
4.	Resultados.	39
4.1.	Valoraciones hematológicas en <i>Calomys musculinus</i> normales.	40
4.2.	Determinación del volumen globular.	40
4.2.1.	Distribución de frecuencias de los datos hallados. Agrupamiento en clases.	42
4.3.	Valores hematológicos de <i>Calomys musculinus</i> no infectados obtenidos durante el periodo 9 - 575 días de vida.	51
4.4.	Hematología del <i>Calomys musculinus</i> infectado.	53
4.4.1.	Evolución de la infección.	53
4.4.2.	Efecto de la infección sobre los parámetros hematológicos. Etapa aguda.	56
4.4.3.	Valoraciones hematológicas. Etapa crónica.	60
4.5.	Glucemia en <i>C. musculinus</i> infectados experimen- talmente.	64
4.5.1.	Fase aguda.	64
4.5.2.	Fase crónica.	64
4.6.	Comparación de los valores de uremia en <i>C. musculinus</i> infectados respecto de controles sanos del mismo rango de edad.	67
4.7.	Proteínas séricas.	68
4.7.1.	Proteínas de <i>C. musculinus</i> no infectado. Fraccionamiento en acetato de celulosa usando como sistema patrón un suero humano normal.	68
4.7.2.	Titulación de virus en cerebros de <i>Calomys</i> <i>musculinus</i> , infectados experimentalmente. Fase aguda.	69

4.7.3.	Fraccionamiento de sueros provenientes de <i>C. musculus</i> inoculados con virus Junin, cepa XJCl ₃ en acetato de celulosa gelificado. Fase aguda de la enfermedad.	70
4.7.4.	Titulación de virus en los cerebros de <i>Calomys musculus</i> , inoculados con virus Junin, cepa XJCl ₃ , cuyos sueros fueron fracionados en gel de poliacrilamida.	72
4.7.5.	Separación electroforética en placa de gel de poliacrilamida de proteínas séricas de <i>Calomys musculus</i> , inoculados con 4000 DL ₅₀ /ml de virus Junin, cepa XJCl ₃ y controles.	73
4.7.5.a.	Fase aguda de la enfermedad.	73
4.7.5.b.	Fase crónica de la enfermedad.	77
4.7.5.c.	Separación electroforética en placa de gel de poliacrilamida de sueros de <i>C. musculus</i> inoculados con virus Junin, cepa XJCl ₃ . Fases aguda y crónica de la enfermedad y sueros controles. Comparación con sueros humanos normales.	80
4.7.5.d.	Fraccionamiento sérico en dos pasos sucesivos: a) acetato de celulosa b) gel de poliacrilamida. Aplicación a sueros provenientes de de <i>C. musculus</i> no inoculados y de seres humanos normales. Comparación de los resultados hallados.	83
4.7.6.	Titulación de virus en cerebros de animales sobrevivientes a la inoculación con virus Junin, cepa XJCl ₃ , cuyos sueros fueron analizados por inmunoelectroforesis.	89
4.7.7.	Inmunoelectroforesis de sueros de <i>C. musculus</i> no inoculados e infectados.	90
5.	Discusión.	96
6.	Bibliografía.	106

1 - INTRODUCCION

1.1. FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA. LA ENFERMEDAD.

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es producida por el virus Junin, perteneciente a la familia Arenaviridae. La enfermedad fue descrita en detalle por primera vez en 1955 (Arribalzaga, 1955) y el agente etiológico de la misma fue aislado por dos grupos de investigadores (Parodi et al., 1958; Pirotsky et al., 1959) a partir de sangre y órganos de pacientes internados en el Hospital Regional de la ciudad de Junin, nombre con que se denominó al virus.

El área endemo-epidémica de la enfermedad comprende la región agrícola-ganadera de mayor importancia del país, originalmente abarcaba 16.000 Km², pero luego fue extendiéndose progresivamente hasta cubrir una superficie de 120.000 Km² (Maiztegui y Sabattini, 1977; Weissenbacher y Damonte, 1983), que comprende el noroeste de la provincia de Buenos Aires, el sur de las provincias de Santa Fe y Córdoba y el norte de la provincia de La Pampa. Sin embargo no se conocen los verdaderos límites, ya que por ejemplo en los alrededores de la localidad de Pila, situada a 180 Km al S.O. de la ciudad de Buenos Aires, fuera de la zona endémica, se encontró la existencia de anticuerpos en el suero de humanos y roedores silvestres y en éstos últimos se aisló virus infeccioso. (Weissenbacher et al., 1985).

Los seres humanos se infectan principalmente a través de la piel debido a la existencia de escoriaciones o por las mucosas buco-faríngeas y/o respiratoria durante el trabajo mecanizado en el período de las cosechas. (Weissenbacher et al., 1987). Estas vías de penetración viral han sido confirmadas por infecciones accidentales en el trabajo (Weissenbacher et al., 1976a; 1978).

El hombre es un accidente dentro del ciclo de vida del virus y no juega ningún rol especial como portador.

1.1.1. Descripción clínica y hallazgos anátomo-patológicos de la FHA.

La FHA puede cursar con manifestaciones clínicas evidentes o no. Las infecciones inaparentes se detectaron en estudios clínico-serológicos realizados en el área endémica. Un 30% de las muestras analizadas presentaron índices de neutralización que indicaron la presencia de anticuerpos anti-Junin en individuos sin manifestaciones clínicas asociadas con FHA (Weissenbacher y Damonte, 1983).

También se encontraron formas asintomáticas de la enfermedad en el 20% de los controles séricos realizados en el personal de laboratorio que emplea virus Junin en su trabajo experimental (Weissenbacher et al., 1980b).

Los primeros síntomas de la FHA se manifiestan después de unos 10 días de haber estado en contacto con el virus (Elsner et al., 1973).

La intensidad con que se desarrolla en los seres humanos es variada aunque los síntomas iniciales son comunes a todos los pacientes: malestares generales, decaimiento, fiebre, diástesis hemorrágica con leucopenia y marcada trombocitopenia.

Los pacientes con FHA fueron agrupados de acuerdo a la severidad de las anomalías neurológicas (Molinas et al., 1989) de la siguiente manera:

- a) Enfermos con FHA que presentan una forma clínica leve, tienen un estado febril que desaparece durante la primera semana de la enfermedad. La única manifestación de la involucración del sistema nervioso central (SNC) es el temblor de la lengua. Una proteinuria transitoria está presente en estos casos.
- b) Cuando la FHA se manifiesta moderadamente (forma clínica común) los pacientes presentan fiebre que persiste durante la segunda semana de la enfermedad. Los signos neurológicos anormales que se observan son temblor de la lengua, hiporreflexia o arreflexia, hipotonía muscular, confusión.

En estos pacientes la proteinuria es de 0,5 a 1,5 g/l.

- c) Los signos descriptos del SNC se intensifican en pacientes con FHA severa (forma clínica grave). Los casos fatales desarrollan un síndrome de shock terminal (10 - 15%). En la forma clínica grave se observan petequias en la mucosa bucal y en la piel, hemorragias gingivales y se han descrito casos con hematurias, metrorragias y sangrado gastrointestinales. La proteinuria es mayor que en la forma moderada.

En todos los casos el diagnóstico de FHA se estableció por aislamiento del virus Junin o por conversión serológica.

El incremento de los leucocitos y de las plaquetas es indicativo de un buen pronóstico en la evolución de la enfermedad, pero la leucopenia y la trombocitopenia no son considerados marcadores de la severidad de la enfermedad.

En un trabajo reciente Cummins et al. (1990) han descrito la presencia de un inhibidor plasmático de la agregación plaquetaria "in vitro", en pacientes con FHA. Esta actividad inhibitoria se manifiesta durante la fase aguda de la enfermedad y parece estar asociada con la severidad de la misma. Esta alteración junto con la plaquetopenia contribuirían a las causas de sangrado en esta patología.

También se ha demostrado la presencia de un inhibidor plasmático de la agregación plaquetaria en pacientes que presentan fiebre de Lassa (Cummins et al., 1989). Relacionando ambos hallazgos, podría pensarse que los disturbios en la hemostasia producida por la infección de estos arenavirus, podrían tener una patogénesis común.

Los tres grupos de pacientes indicados anteriormente presentan resultados análogos para las diferentes pruebas de coagulación (Molinas et al., 1989). Por lo tanto los resultados hallados se analizaron en forma conjunta.

La prueba del tiempo de tromboplastina parcial con caolín (TTPC) está prolongada durante la fase aguda de la enfermedad (incluye los primeros 11 días de la enfermedad) y retorna a la normalidad alrededor del día 14.

Los resultados de los estudios tromboelastográficos descritos por Schwarz et al. (1972) coinciden con el hallazgo de un TTPC prolongado, ya que ambas pruebas ponen de manifiesto el camino intrínseco de la coagulación.

Además Molinas et al. (1989) encuentran la actividad de los factores VIII:C, IX y XI por debajo de los valores normales. Pero este hallazgo no explica completamente el tiempo de TTPC prolongado.

En contraste con la disminución de la actividad del factor VIII:C, se encontró aumentado el nivel del factor Von Willebrand (VIIIIR:Ag), durante el curso de la fase aguda de la FHA. La discrepancia hallada entre estos dos parámetros, va desapareciendo con el transcurso de la enfermedad.

Otra alteración hallada, es el aumento uniforme de la actividad del factor V, durante el transcurso de la fiebre hemorrágica.

El nivel del fibrinógeno (reactante de fase aguda) es normal en los casos suaves y se encuentra aumentado en los casos moderados o severos de la FHA. En general no se detectaron productos de degradación del fibrinógeno, como indicadores de activación del mecanismo de fibrinólisis.

Por evidencias clínicas y de laboratorio halladas hasta ahora, pareciera que la coagulación intravascular diseminada no sería un fenómeno patogénico importante en el curso de la enfermedad (Molinas et al., 1989).

La patogénesis de algunas fiebres hemorrágicas de origen viral ha sido relacionada con la activación del sistema complemento por la intervención de complejos inmunes circulantes (Bokisch et al., 1973).

Los complejos inmunes pueden activar ambos mecanismos: complemento y coagulación. Se realizó un estudio de ambas actividades en muestras de sangre seriada provenientes de pacientes con FHA desde 1976 a 1986 (Molinas et al., 1989).

En el mencionado estudio se midió la actividad hemolítica total del complemento, el nivel sérico de los componentes del

complemento y la presencia de complejos inmunes circulantes.

Durante la fase temprana aguda de la FHA (días 5 - 10), se encontró que el complemento estaba activado en los casos severos y moderados de la enfermedad, coincidiendo con el deterioro de la coagulación. Se halló una moderada reducción de la actividad total del complemento con decrecimiento de la actividad de C_1 y normal de la actividad de C_4 (De Bracco et al., 1978).

Los niveles antigénicos de C_{1q} , C_3 y C_5 medidos por inmunodifusión radial se encontraron disminuidos en formas clínicas moderadas o severas, pero hay un marcado incremento en el antígeno C_4 que no está en concordancia con su actividad hemolítica.

Productos de degradación de C_3 y factor B se encontraron en sueros de pacientes con FHA.

Pacientes que recibieron plasma de individuos convalecientes, presentaron un patrón de activación del complemento similar al descripto.

Los complejos inmunes circulantes se encontraron raramente y fueron detectados solamente después de la aparición de anticuerpos contra virus Junin, relativamente tarde en el curso de la enfermedad (días 12 - 20).

Se concluye que el rol de la activación del complemento en la patogénesis de la FHA no es claro, los complejos inmunes circulantes no parecen estar relacionados con las manifestaciones clínicas o las anormalidades de la coagulación observadas durante la fase temprana de la enfermedad (Molinas et al., 1989).

Los hallazgos anátomo-patológicos realizados por Elsner et al. (1973), demostraron que la patología de la FHA está caracterizada por alteraciones capilares generalizadas, hemorragias multiviscerales, daño renal, necrosis focal en el hígado. Como en otras fiebres hemorrágicas de origen viral se encontró hiperplasia de células reticulares y eritrofagocitosis en los nódulos linfáticos e hipoplasia moderada en la médula ósea.

Las alteraciones descritas, muchas veces estaban acompañadas por lesiones producidas por infecciones bacterianas secundarias que son características de muchas enfermedades virales.

En el hígado se describió la presencia de cuerpos acidófilos similares a los descritos en la fiebre amarilla, hepatitis vírica y en varias fiebres hemorrágicas. Además este órgano presentaba necrosis focal y las células de Kupffer se observaban hipertróficas con evidencia de eritrofagocitosis (Gallardo, 1970; Elsner et al., 1973).

Los riñones estaban aumentados de tamaño con una médula congestiva y con hemorragias perivasculares y pélvicas. Se describieron focos de necrosis hemorrágicos en las papilas renales, siendo esta lesión un hallazgo constante en necropsias de enfermos de otras fiebres hemorrágicas de origen viral, incluyendo la Fiebre Hemorrágica Coreana.

En autopsias realizadas en pacientes con FHA, se ha encontrado que los sitios de necropsia celular corresponden a sitios de acumulación de antígeno viral. Estos hallazgos fueron realizados aplicando la técnica de inmunofluorescencia.

En un estudio de tejidos realizado en siete víctimas de FHA, el antígeno viral se encontró en hepatocitos, en el epitelio renal tubular, en macrófagos y en células dendríticas reticulares del bazo y de los nódulos linfáticos (Cossio et al., 1975; González et al., 1980; Maiztegui et al., 1975).

El virus Junin se aisló del bazo y de los nódulos linfáticos en las siete necropsias investigadas.

A pesar de los esfuerzos realizados por los diversos investigadores para realizar los estudios clínicos y los hallazgos anátomo-patológicos, no se ha podido esclarecer aún el mecanismo por el cual el virus produce desórdenes en la función orgánica y muerte.

1.2. VIRUS JUNIN. EL AGENTE ETIOLOGICO.

1.2.1. Familia Arenaviridae.

En el año 1970 se propuso designar con el nombre de arenavirus a un grupo de virus que compartían características morfológicas, serológicas y físico-químicas (Rowe et al., 1970a). Pero recién en 1976 (Fenner, 1976), el Comité Internacional de Taxonomía Viral dispuso clasificar al grupo viral como familia con el nombre de Arenaviridae.

A pesar de que todos los miembros de la familia dan reacciones cruzadas por inmunofluorescencia indirecta (Rowe et al., 1970b), se vislumbraron desde el principio dos grupos en los que se podían agrupar a especies más afines: Arenavirus del Viejo Mundo y el complejo Tacaribe, también llamados Arenavirus del Nuevo Mundo. Esta división está sustentada por relaciones antigénicas, así todos los integrantes del grupo Tacaribe comparten un antígeno fijador del complemento, mientras que los Arenavirus del Viejo Mundo no lo hacen.

El primer miembro reconocido de esta familia fue el virus de la Coriomeningitis Linfocitaria del ratón (LCMV) (Amstrong y Lillie, 1934), y es la especie prototipo de la familia que está diseminada universalmente. Con el transcurso de los años se fueron descubriendo nuevos componentes de la familia Arenaviridae y en la actualidad se conocen como integrantes de los virus del Viejo Mundo al LCMV y lo acompañan además los virus africanos Lassa, Mobala y Mopeia.

El complejo Tacaribe abarca nueve especies de virus americanos Tacaribe, Machupo, Junin, Amaparí, Pichindé, Paraná, Tamiami, Flexal y Latino (Howard, 1986). Recientemente se ha postulado al virus Guanarito, aislado en Venezuela (Salas et al., 1991) como nuevo integrante del complejo.

Es característica distintiva de esta familia su morfología. Las partículas virales son en todos los casos redondas, ovales o pleomórficas con un diámetro que oscila entre 60 y 350 nm, poseen una membrana con proyecciones superficiales de 2 a 10 nm de longitud, que sobresalen de una envoltura lipoproteica.

Tienen gránulos internos de 26 nm de diámetro, indistinguibles por su morfología y composición bioquímica de los ribosomas celulares (Murphy et al., 1970, 1973; Murphy y Whitfield, 1975).

El material genético está constituido por ácido ribonucleico (ARN), cadena simple fragmentada.

En la naturaleza los arenavirus están asociados a roedores muroideos, con la excepción del virus Tacaribe, originalmente aislado de murciélagos del género *Artibeus*, en la isla de Trinidad (Downs et al., 1963). Los componentes del complejo Tacaribe están asociados a roedores pertenecientes a la familia Cricetidae, mientras que los Arenavirus del Viejo Mundo están vinculados a roedores de la familia Muridae.

Los arenavirus patógenos para el hombre son el virus Junin; el virus Machupo, agente causante de la Fiebre Hemorrágica Boliviana (FHB), que es una enfermedad semejante a la FHA; el virus Lassa quien produce una severa enfermedad febril con alta tasa de mortalidad; el LCMV que induce infecciones leves o inaparentes (Walker y Murphy, 1987) y el virus Guanarito, agente causante de la Fiebre Hemorrágica Venezolana, de características semejantes a la enfermedad producida por el virus Lassa (Salas et al., 1991).

1.2.2. Características de los arenavirus.

El genoma de los arenavirus está constituido por dos fragmentos de ácido ribonucleico de cadena simple. Estos trozos se denominan según su tamaño L (large, 33S) y S (small, 25S) (Carter et al., 1973; Rawls y Buchmeier, 1975; Añon et al., 1976; Veza et al., 1978; Bishop y Auperin, 1987).

Los viriones purificados presentan dos o tres proteínas estructurales mayoritarias. El polipéptido más abundante es la nucleoproteína NP (60 - 68 KDa) que constituye el 56 - 60% del total de las proteínas y está firmemente unida al ARN viral (Veza et al., 1977).

Se han descrito dos glicoproteínas de envoltura GP₁ (44 - 64

KDa) y GP₂ (35 - 41 KDa) para los virus Pichindé, LCMV, Lassa y VJ (Veza et al., 1977; Martinez Segovia y De Mitri, 1977; Buchmeier y Oldstone, 1978; Clegg y Lloyd, 1983; Ghiringhelli et al., 1991). Para los virus Tacaribe y Tamiami solamente se ha identificado una glicoproteína (77 - 79 KDa) (Gard et al., 1977).

Entre los constituyentes proteicos menos abundantes se encuentra una proteína de 180 - 200 KDa que se atribuye a la replicasa-transcriptasa (L) y otras de menor PM que son producto de degradación de NP (Buchmeier y Parekh, 1987).

En investigaciones realizadas en lisados de células infectadas, se identificaron las proteínas nombradas anteriormente y el precursor glicosilado de las proteínas de envoltura GPC (66 - 72 KDa) (Buchmeier y Parekh, 1987).

Las proteínas NP y L estarían en íntima asociación con los fragmentos ARN, dando origen a dos nucleocápsides helicoidales. Las glicoproteínas GP₁ y GP₂ están dispuestas en la superficie interna del virión formando parte de la envoltura (Buchmeier y Parekh, 1987). Pero sólo una de las glicoproteínas estaría expuesta en los virus LCMV y VJ (Bruns y Lehmann Grube, 1983; Mersich et al., 1988).

El ARN-S codifica la nucleoproteína NP y el precursor de las glicoproteínas GPC. Se ha demostrado para los virus Pichindé, LCMV, Lassa, Tacaribe y VJ que la estrategia de replicación es "ambisense" (Auperin et al., 1984; Romanowski et al., 1985; Clegg y Oram, 1985; Auperin et al., 1986; Franze Fernández et al., 1987; Ghiringhelli et al., 1991).

El ARN-L contiene los genes por los cuales se sintetizan la replicasa-transcriptasa (L) y una pequeña proteína con estructura "zinc-finger" (Z) (Salvato y Shimomaye, 1989; Salvato et al., 1989; Iapalucci et al., 1989 a y b). También se ha comprobado la existencia de una codificación "ambisense" de los genes de L y Z ubicados en el segmento ARN-L del LCMV (Salvato y Shimomaye, 1989).

Esta forma de replicación tan particular de los arenavirus ha sido descrita en detalle (Bishop, 1986). La mitad 3' del segmento ARN-S es complementaria a uno de los ARN mensajeros

(ARN-m) que traduce la proteína NP. El extremo 5' del ARN-S es idéntico al ARN-m de la proteína GPC. De este modo el ARN-m de GPC no puede ser transcrito hasta que no comienza la replicación del ARN-S, precedida de la transcripción del ARN-m de NP a partir del extremo 3'.

Entre estos dos genes de distinta polaridad se observa la presencia de una región intergénica que contiene una secuencia de nucleótidos complementarios, formando una configuración de rulo o "loop". Esta estructura funcionaría como señal de terminación de la transcripción (Bishop, 1986).

Ghiringhelli y Col (1991) han demostrado que la organización y estrategia de codificación del ARN-S del VJ son similares a las encontradas en otros arenavirus. Los autores señalan que la región intergénica del VJ presenta dos rulos o "loop" consecutivos. Los virus Tacaribe y Mopeia también poseerían esta estructura estable.

Se ha encontrado una identidad del 50% entre la secuencia de aminoácidos de GP₁ del VJ y la glicoproteína del virus Tacaribe. Esta similitud sería la causa de la protección cruzada o neutralización cruzada encontrada en ensayos realizados con ambos virus (Weissenbacher et al., 1976b, 1982).

1.2.3. Cepas de virus Junin.

Cepas de campo son aquellas que fueron aisladas de muestras de sangre y/o vísceras de roedores silvestres o de pacientes con FHA. A partir de estos aislamientos se obtuvieron las cepas de VJ en el laboratorio.

Mencionaremos a continuación las cepas de mayor uso en la investigación:

XJ: cepa prototipo de virus Junin, fue aislada por el Dr. Parodi (1958) a partir de un caso humano de FHA y luego fue sometida a varios pasajes en el laboratorio.

RC: aislada de un caso humano de FHA (Boxaca, 1977).

GAR: aislada en Pergamino en el año 1966 a partir de sangre de una enferma de FHA (Berría, 1977).

Las cepas mencionadas anteriormente son altamente patógenas. A partir de la cepa XJ, se aislaron variantes atenuadas, como las cepas XJCl₃, XJ₀, XJ₄₄ y Candid 1.

XJCl₃ : proviene del pasaje C₇R₁₁ (2º pasaje por plasma de cobayo y 11º pasaje por cerebro de ratón) de la cepa XJ, que fue remitida liofilizada a la Rockefeller Foundation Laboratories (New York, EEUU), quienes a su vez lo enviaron al laboratorio of Tropical Virology del NIH (Bethesda, Md, EEUU) donde después de algunos pasajes fue clonada en las células MA111, línea heteroploide de riñón de conejo, obteniéndose la cepa XJCl₃ (Guerrero y Boxaca, 1980).

XJ₀: se sospechó que la atenuación de la cepa XJCl₃ se hubiera producido con anterioridad a su clonado en las células MA111, debido a lo expuesto se decidió estudiar la variante de donde derivara la cepa atenuada cepa XJCl₃. Esta variante había sido enviada a los Estados Unidos en 1959 en su pasaje C₇R₁₁, donde fue mantenida por inoculación en cerebro de ratón recién nacido hasta el pasaje C₇R₁₆. A partir de ese momento fue liofilizada y mantenida a - 60 °C hasta 1977 en que fue remitida nuevamente a Buenos Aires (Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina (UBA)).

Se realizaron estudios comparativos entre las dos cepas: XJCl₃ y XJ₀ y se encontró que ambas cepas muestran un comportamiento similar (Guerrero y Boxaca, 1980).

XJ₄₄: es una cepa atenuada que representa el pasaje Nº 44 por cerebro de ratón lactante de la cepa parental virulenta XJ (Kenyon et al., 1985).

Candid 1: derivada de la cepa XJ₄₄. Ha sido clonada y pasada 18 veces en la línea diploidea FRhL (pulmón fetal del mono Rhesus) (Barrera Oro y Eddy, 1982).

A partir de cricétidos se han aislado diversas cepas, como ser:

MC₇: obtenida en la localidad de Mones Cazón (Pcia. de Bs.As.)

a partir de las visceras de un cricétido del género *Calomys* (Berría et al., 1967).

PR₅: esta cepa se usó para obtener antígeno fijador de complemento (Mettler et al., 1961).

Cba An 9446: fue aislada de sangre entera de un ejemplar de *C. musculinus*, capturado en el área endémica de la FHA, en la provincia de Córdoba (Sabattini et al., 1977).

De todas las cepas nombradas, la cepa XJ ha sido sistemáticamente empleada como cepa patógena de referencia en los estudios experimentales sobre FHA.

La cepa atenuada cepa XJCl₃ que fuera inoculada en humanos, demostró una real atenuación (Rugiero et al., 1969; Parodi et al., 1970) ha sido la más utilizada hasta el momento en los trabajos de virología experimental en cricétidos. Así mismo se han realizado muchos estudios en estos roedores con la cepa Cba An 9446.

La cepa Candid 1, es la cepa vacunal actual. La evolución clínica de los primeros seres humanos vacunados mostró un bajo nivel de efectos colaterales. La vía de administración más adecuada fue la intramuscular. Se observó conversión serológica en el 95% de los vacunados (Mac Donald et al., 1986; Barrera Oro et al., 1986). La inmunidad celular fue medida por el ensayo de transformación de linfocitos, en este caso el 98% de los vacunados respondieron positivamente (Kenyon et al., 1988).

1.3. RESERVORIOS DEL VIRUS JUNIN Y OTROS ARENAVIRUS.

Los arenavirus están estrechamente relacionados con los roedores en la naturaleza. A pesar de que existen en el mundo alrededor de 1700 especies de roedores agrupados en 34 familias, los arenavirus están asociados solamente a dos de ellas: Muridae y Cricetidae (Arata y Gratz, 1975).

El complejo Tacaribe está asociado a roedores pertenecientes a la familia Cricetidae, con excepción del virus Tacaribe que como se dijo antes fue originalmente aislado de murciélagos del género *Artibeus*, en la isla de Trinidad (Downs et al., 1963). Los arenavirus del Viejo Mundo están vinculados a roedores de la familia Muridae, particularmente a los géneros *Mus* (LCMV) y *Mastomys* o *Praomys* (complejo Lassa).

En el cuadro N^o 1 se presentan las especies de mamíferos conocidos, asociados con los arenavirus (Howard, 1986).

La relación entre la FHA y los roedores silvestres del área endémica fue señalada cuando se describió la enfermedad (Arribalzaga, 1955).

Otros investigadores (Parodi et al., 1959; Sabattini, 1966; Sabattini, 1977) terminaron de establecer la importancia de los cricétidos campestres en el ciclo natural del virus Junin. El virus se aisló a partir de tres especies de roedores: *Calomys musculinus*, *Calomys laucha*, *Akodon azarae*, siendo la primer especie la más importante en la cadena epidemiológica, debido a que se realizaron aislamientos positivos de virus Junin en un número elevado de *Calomys musculinus* (Sabattini et al., 1977).

Se han realizado numerosos estudios sobre la ecología y control de roedores involucrados en la FHA.

Un muestreo de las especies de roedores silvestres de la zona endémica de la FHA, cultivada con finalidad agrícola, demuestra que la distribución de los roedores sigue ciertas reglas generales.

En los campos cultivados hay un amplio predominio de las

especies de roedores del género *Calomys* : *C.laucha* , *C.musculus*.

En cambio en las pasturas no perturbadas hay predominio de las especies del género *Akodon* : *Akodon azarae*, *Akodon obscurus* junto a *Oryzomys nigripens*. En el domicilio y peridomicilio la laucha doméstica (*Mus musculus*) y las ratas (*Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*) son las especies dominantes (Kravetz, 1977).

Sin embargo es posible capturar cualquiera de estas especies fuera del ambiente donde es dominante.

De Villafañe et al., (1977) sugieren que la composición de la comunidad de roedores antes de las labores de la agricultura, sería semejante a la observada en los ambientes estables.

Al trabajar el campo para su producción agrícola se distinguen dos tipos de habitat: borde y cultivo.

En los bordes se mantiene una composición semejante a la del habitat original y en los cultivos se desarrollan las especies capaces de adaptarse a los cambios impuestos por las labores agrícolas. A estos tipos de especie pertenece el género *Calomys*.

De lo expuesto anteriormente concluimos que el *Calomys musculus* , es el principal reservorio natural del virus Junin, por ser una de las especies que abundan en los campos de cultivo y por su elevada susceptibilidad a contraer infecciones persistentes.

El estudio de un área no endémica de la FHA, como es la localidad de Pilar (Pcia. Bs.As.) reveló la existencia de dos pobladores que sufrieron infección subclínica de la nombrada enfermedad.

A pesar que en los roedores silvestres de la zona se comprobó el predominio del género *Calomys*, se aisló virus con características biológicas y antigénicas del VJ, en el cerebro de un *Akodon azarae*. Esto llevó a suponer que en el futuro podían aparecer casos clínicos de FHA, en zonas no reconocidas actualmente como endémicas (Weissenbacher et al., 1985).

ESPECIES DE MAMIFEROS CONOCIDOS
ASOCIADOS CON ARENAVIRUS

<u>VIRUS</u>	<u>ESPECIES</u>	<u>LOCALIZACION</u>	<u>HABITAT</u>
VIRUS DEL VIEJO MUNDO			
LCMV	<i>Mus musculus</i>	Europa y América	Peridoméstico
Lassa	<i>Mastomys natalensis</i>	Oeste de Africa	Sabana
Nopeia	<i>Mastomys natalensis</i>	Sur de Africa	Sabana
Mobala	<i>Pracomys ssp</i>	Africa central	Sabana
VIRUS DEL NUEVO MUNDO			
Junin	<i>Calomys musculus</i> <i>Calomys laucha</i> <i>Akodon azarae</i>	Argentina	Praderas
Machupo	<i>Calomys callosus</i>	Bolivia	Praderas , Peridoméstico
Tacaribe	<i>Artibeus literatus</i> <i>Artibeus jamaicensis</i>	Trinidad	Bosque , periurbano
Anapari	<i>Oryzomys goeldii</i> <i>Neacomys guianae</i>	Anapa, Brasil	Bosque tropical
Plexal	<i>Oryzomys ssp</i>	Para, Brasil	Bosque tropical
Pichindé	<i>Oryzomys albigularis</i> <i>Thomasomys fuscatus</i>	Colombia	Bosque tropical, ríos y valles
Latino	<i>Calomys callosus</i>	Bolivia, Brasil	Praderas , peridoméstico
Paraná	<i>Oryzomys buccinatus</i>	Paraguay	Bosque tropical, sabana
Tamiami	<i>Sigmodon hispidus</i>	Florida, USA	Tierras pantanosas

Datos obtenidos de Howard, CR (1986).

1.3.1. Estudios realizados en colonias de cricétidos.

Para poder llevar a cabo investigaciones en etapas lógicas y sucesivas sobre la infección de roedores con arenavirus, es fundamental el conocimiento básico de la biología de los mismos, para lo cual es necesario el establecimiento de colonias de cricétidos en el laboratorio.

Los distintos aspectos de la respuesta a la infección experimental de roedores con arenavirus, así como los mecanismos de transmisión pueden ser evaluados cuando se realizan investigaciones en animales de experimentación provenientes de colonias mantenidas en condiciones estandar de bioterio.

Son de gran utilidad para nuestro país todos los aportes sobre las especies de los géneros *Calomys* y *Akodon*, por ser los principales transmisores del virus Junin en el ciclo natural de la FHA (Sabattini et al., 1977).

En investigaciones más recientes se ha comprobado que los cricétidos *Akodon azarae*, *Akodon dolores*, *Akodon molinae* y *Calomys callidus* son capaces de desarrollar infecciones persistentes, cuando son infectados experimentalmente con virus Junin, cepa XJCl₃ (Videla, 1988). Si estos roedores se infectaran naturalmente cabría esperar una mayor expansión del área endémica de la FHA.

En la República Argentina se han realizado estudios sobre los parámetros de crecimiento y reproductivos en colonias de cricétidos, como ser *Akodon azarae* (De Villafañe, 1981a), *Akodon molinae* y *Akodon dolores* (Merani y Lizarralde, 1980; Merani et al., 1983), *Calomys musculinus* (De Villafañe, 1981b), *Calomys laucha* (Kravetz et al., 1981) y *Calomys musculinus*, *Calomys laucha* y *Calomys callidus* (Hodara, 1987).

Desde el punto de vista bioquímico se han estudiado colonias de *C.musculinus*, *C.laucha* y *C.callidus* (Hodara, 1987). Estas determinaciones comprenden valoraciones hematológicas, dosaje de las enzimas sanguíneas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotranferasa (AST), cuantificación de proteínas totales, proteinogramas y análisis químico de orina empleando

tiras reactivas.

Los resultados hallados contribuyen a la caracterización de las especies de cricétidos. Por otro lado se hallaron valores de referencia que son de utilidad para realizar futuras investigaciones en el tema que nos atañe.

1.4. INFECCION EXPERIMENTAL DEL *Calomys musculinus* CON VJ.

1.4.1. Estudios realizados utilizando la cepa XJCl₃.

La infección experimental del *Calomys musculinus* con la cepa atenuada XJCl₃ fue estudiada en forma intensa por distintos investigadores, en virtud de lo cual se han publicado numerosos trabajos utilizando el modelo mencionado.

C.musculinus de 1-10 días de edad inoculados con la cepa XJCl₃ por vía ip, desarrollaron una enfermedad cuyas primeras manifestaciones fueron disminución en los reflejos y erizamiento del pelo. Progresivamente los animales mostraron una acentuada lateralización en la marcha, acompañada de temblores y/o convulsiones. Como consecuencia de la enfermedad se registró una mortalidad superior al 50% entre los cricétidos infectados.

La respuesta de los animales sobrevivientes a la infección no fue uniforme, ya que algunos quedaron afectados (menor tamaño, hiperexitados) mientras que en otros los signos de enfermedad desaparecieron por completo. Un grupo de cricétidos, a pesar de haber sido inoculados de manera similar a los restantes, nunca enfermó. (Lampuri et al., 1982).

La patogénesis de la infección de *C.musculinus*, con la cepa XJCl₃ sería probablemente de origen inmunológico, dado que la administración de suero antitimocito en los cricétidos neonatos en días subsiguientes a la infección, produce un retraso en la aparición de los signos clínicos, una menor morbilidad y una significativa disminución de la mortalidad (Coulombié et al., 1986a).

En aquellos *C.musculinus* que superaron la etapa aguda de la

infección, así como en algunos que nunca presentaron signos de enfermedad, se detectó una infección persistente con altos títulos virales en cerebro (Lampuri et al., 1982), en algunos casos el aislamiento viral también fue positivo en glándulas salivales y bazo (Lampuri., 1984), ocasionalmente se presentaron viremias recurrentes (Alché y Coto, 1986), se observó la presencia de lesiones anatomopatológicas en grandes áreas del cerebro, histológicamente descritas como meningoencefalitis (Laguens et al., 1982b) y en todos los casos se detectaron anticuerpos neutralizantes anti-virus Junin (Lampuri, 1984).

El virus recuperado de cerebro o sangre de *C.musculus* provenientes de la etapa aguda o crónica de la enfermedad fue neutralizado parcialmente por el suero del mismo animal. Por otra parte este mismo suero neutralizó en alto título a la cepa parental utilizada para la infección del cricétido estudiado.

La aparición de nuevas partículas virales variadas antigénicamente, permitirían al virus Junin evitar la acción de los anticuerpos neutralizantes que se generan como consecuencia de la replicación del mismo en *C.musculus* (Lampuri y Coto, 1983; Alché y Coto, 1986; Alché y Coto, 1988).

Han sido caracterizadas algunas propiedades biológicas de estas variantes antigénicas, aisladas de sangre de *C.musculus*, que habían sido infectados con virus Junin, cepa XJCl₃ (Alché y Coto, 1988).

Anteriormente se ha señalado que la respuesta inmune humoral, no fue capaz de neutralizar el virus del *C.musculus*. Esta conclusión está complementada por los experimentos realizados con ciclofosfamida que fue administrada en concentraciones suficientes para interferir con la síntesis de anticuerpos en los *C.musculus*. Se verificó que no se modifica el curso de la infección tanto en cricétidos adultos como en lactantes, demostrando que los anticuerpos neutralizantes carecerían de importancia como mecanismo humoral de defensa (Coulombié y Coto, 1985).

Como ya describimos los *C.musculus* neonatos son sensibles a la inoculación de virus Junin, cepa XJCl₃ por vía ip, pero a medida que aumenta la edad del animal, se observa una mayor resistencia a la infección. Este proceso concluye a los 15 días

de vida, edad en la cual los cricétidos son completamente resistentes a la inoculación por vía ip de XJCl₃ (Coulombié et al., 1986b).

Se observó que el virus Junin replica eficazmente en macrófagos peritoneales, de *C.musculus* adultos y neonatos. Esta situación no permitía explicar si el macrófago estaba involucrado en la resistencia edad-dependiente observada en los roedores.

Los estudios realizados empleando sílica, agente relativamente tóxico para los macrófagos sugieren un diferente comportamiento de los mismos, dependiendo de la edad del animal. Los macrófagos peritoneales de *C.musculus* neonatos actuarían probablemente como sitio primario de multiplicación viral, en cambio los de los cricétidos adultos desempeñarían una actividad antiviral extrínseca, evitando la replicación viral en otro tipo celular susceptible y creando la barrera edad-dependiente mencionada anteriormente (Coulombié et al., 1986b).

Se induce una infección persistente en *C.musculus* adultos con la cepa XJCl₃, cuando se emplea la vía de infección in. En este caso mueren aproximadamente el 50% de los animales inoculados como consecuencia del desarrollo de una meningoencefalitis. Todos los cricétidos presentaron anticuerpos neutralizantes, aún aquellos que evolucionaron sin signos de enfermedad. No se observó eliminación de virus por fauces y orina (Laguens et al., 1982a).

Estudios realizados establecen que se puede lograr transmitir la infección horizontalmente pero no se pudo demostrar transmisión vertical en este modelo, hasta ahora (Lampuri et al., 1985)

1.4.2. Infección del *C.musculus* con la cepa Cba An 9446 del virus Junin.

La información obtenida con las cepas salvajes del virus Junin, es menos abundante.

Sabattini et al. (1977) han demostrado que la infección neonatal del *C.musculus* con la cepa Cba An 9446 por vía intracerebral o intranasal, induce en el hospedador una infección asintomática y persistente, acompañada de eliminación de virus por orina y saliva así como de viremia.

Resultados semejantes fueron encontrados por Vitullo et al. (1987), cuando utilizaron la vía intranasal para inocular *C.musculus* neonatos con la cepa Cba An 9446, pero los investigadores registraron una mortalidad de alrededor del 70% entre los días 24-40 post infección, precedida de un retraso en el crecimiento de los animales. Los cricétidos sobrevivientes presentaron una marcada reducción en la fertilidad.

El 50% de los *C.musculus* adultos infectados con la cepa Cba An 9446 por vía intranasal desarrollaron persistencia viral con presencia de virus en sangre, orina y saliva y se comprobó que la síntesis de anticuerpos inmunofluorescentes fue nula o escasa y tardía. (Sabattini et al., 1977; Martinez Peralta et al., 1979; Vitullo, 1989). El resto de los animales inoculados establecen una respuesta inmunocompetente caracterizada por la presencia de anticuerpos séricos inmunofluorescentes y clarificación del virus (Vitullo, 1989).

En ambos tipos de respuesta no se detectaron modificaciones en la capacidad reproductiva, sobrevida ni alteraciones en el peso corporal, respecto de los controles (Vitullo, 1989).

Un importante sitio de replicación del virus Junin lo constituyen las glándulas salivales del *C.musculus*. Lo mencionado anteriormente ha sido demostrado por estudios realizados por Martinez Peralta et al. (1979), utilizando la Cba An 9446 para infectar a los cricétidos. Se comprobó que las glándulas salivales contiene numerosas partículas virales que fueron visualizadas utilizando la técnica de microscopía electrónica.

Se realizaron estudios sobre la sobrevivencia del virus Junin en la naturaleza en el año 1977 (Sabattini et al.). Se demuestra experimentalmente que la transmisión horizontal ocurre cuando el contacto entre roedores es estrecho y continuado y relacionado con la eliminación de virus en orina y saliva. Se encontró que la infección también puede transmitirse de las hembras a sus

crías durante la lactancia (transmisión vertical post-natal) (Sabattini et al., 1977).

Estas observaciones previas fueron estudiadas en forma exhaustiva por Vitullo (1989), quien realizó la cuantificación de la transmisión vertical (post-natal) y horizontal del virus Junin, Cba An 9446, utilizando el modelo matemático de FINE (1975). El autor llegó a la conclusión que tanto la transmisión vertical como la horizontal son insuficientes como mecanismos únicos para mantener la asociación del virus Junin con *C. muscúlinus* y se logra la prevalencia en la naturaleza de dicha asociación en base al equilibrio entre ambas formas de transmisión.

2 - OBJETIVOS

OBJETIVOS. En virtud de las investigaciones realizadas sabemos que el *Calomys musculinus* es uno de los principales eslabones en el ciclo de transmisión de la FHA.

Cuando el *C.musculinus* neonato es inoculado experimentalmente con la cepa XJCl₃ de virus Junin, desarrolla una enfermedad que cursa en dos fases: aguda y crónica.

Los objetivos de los estudios que se presentarán a continuación fueron contribuir al conocimiento de la hematología, de variables de química clínica como glucemia y uremia y del cuadro proteico del cricétido, en ambas fases de la enfermedad.

3 - MATERIALES Y METODOS

3.1. Virus.

Virus Junin

La cepa ZJC₁ de virus Junin (Guerrero y Boxaca, 1980), fue propagada en cerebro de ratón blanco lactante. El virus utilizado en este trabajo tenía 14 pasajes en dicho huésped, después de clonado, con título del $1,1 \times 10^7$ DL₅₀/ml para ratón blanco neonato, cepa OF₁ (IFPA - Credo, Lyon, Francia)

3.2. Cultivo de Tejidos.

Se utilizó la línea continua proveniente de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aetiops*, denominada Vero. La línea fue mantenida por repiques semanales en medio MEM (Medio Esencial Mínimo) en solución salina balanceada de Earle, con glutamina y aminoácidos no esenciales (Medio Sintético GIBCO), suplementado con 5% de suero de ternera (ST) GIBCO previamente inactivado durante 30 min a 56 °C y adicionado de 50 µg de gentamicina. Cuando las células alcanzaban la confluencia se las mantenía en 33 °C con medio basal de Eagle (MBE) en solución salina balanceada de Earle, con glutamina (Medio Sintético GIBCO) suplementado con 2% ST GIBCO y 50 µg/ml de gentamicina.

Esta línea se utilizó para la titulación de VJ a partir de los cerebros de *C. musculus* infectados. Para realizar la titulación se utilizó el método de unidades formadoras de placas bajo agar (Danonte y Coto, 1974).

3.3. Animales.

3.3.1. *Calomys musculus*.

La colonia de *C. musculus* se originó a partir de unos cuantos ejemplares de *C. musculus* cedidos por la Dra. M.S. Sabattini. Se realizaron estudios morfométricos y citogenéticos para caracterizarlos (D'Aitolo y et al., 1981).

Los *C. musculus* son criados en el bioterio de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Se siguen las normas para roedores utilizados en el bioterio de Farmacología, Bromatología. A partir de los animales que le dieron origen, la colonia ha sido mantenida cerrada. Los animales que van a ser usados en el mantenimiento de la colonia se obtienen por apareamiento monogámico, en cambio se utiliza el sistema de organización poligámico para los cricétidos que van a ser usados en diseños experimentales. Se ha comprobado que el período de gestación en los *C. musculus* es de 20 a 21 días y que el tiempo óptimo para el destete de las crías oscila entre 21 - 23 días de vida.

3.3.2. Ratones blancos:

OF₁ (IPFA - Credo, Lyon, Francia), se obtuvo de la colonia cerrada del bioterio de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Ratones de 2 - 3 días de edad se emplearon para la preparación de stock de VJ.

3.3.3. Conejos New Zealand White:

Se emplearon dos animales de exocria de 1,5 - 2 kg de peso, obtenidos de Bioterio Central de La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Se utilizaron para obtener antisueros anti proteínas séricas de *C.musculus*.

3.4. Preparación de los stocks de Virus Junin.

En cerebro de ratón lactante.

Se inocularon ratones albinos de 24 hs de vida por vía ic con 10^3 UFP de virus Junin en 0,02 ml en PBS. A los 7 días pi se sacrificaron los animales y se cosecharon los cerebros. Se preparó un homogenato al 10% (P/V) de cerebro de ratón en PBS isotónico, PH: 7,4, conteniendo 10% de suero de ternera inactivado. El homogenato se centrifugó a 10.000 x g durante 1 h a 4 °C y el sobrenadante se fraccionó y se utilizó como fuente de virus, conservándose a 70 °C hasta su uso.

3.5. Aislamiento y titulación de virus.

Los cerebros de *C.musculus* infectados con la cepa XJCl₃ de VJ fueron extraídos estérilmente. Para poder realizar la pesquisa de virus se procesaron las muestras obtenidas de la siguiente manera: se maceraron los cerebros en morteros estériles sobre hielo y se suspendieron al 10% (P/V) en PBS conteniendo suero de ternera inactivado en concentración de 3%. Se procedió a centrifugar las suspensiones a 10.000 xg durante 45 min a 4 °C. Los sobrenadantes se conservaron a 70 °C hasta su uso.

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

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

Las titulaciones de virus se realizaron utilizando los siguientes métodos:

3.5.a. Unidades formadoras de placas bajo agar.

Se utilizó el método de Damonte y Coto (1974).

Se utilizaron monocapas de células Vero, cultivadas durante 24 hs en botellas de 15 ml de capacidad. Se prepararon diluciones seriadas decimales del virus y se inoculó 0,2 ml de cada dilución por botella. Se dejó absorber el virus durante una hora a 37 °C agitando suavemente las botellas cada 15 min aproximadamente. Luego se retiró el inóculo y se cubrieron cada una de las monocapas con 3 ml de medio sólido nutritivo compuesto por partes iguales de una solución de agar al 2% en agua bidestilada y MEM en concentración doble, con respecto a la usada habitualmente, suplementado con 4% de suero fetal bovino inactivado. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente; posteriormente las botellas se incubaron en forma invertida por el término de 7 días a 37 °C. Al cabo de los cuales se procedió a revelar las placas de lisis para lo cual las células fueron fijadas con formol al 10% durante 30 min y luego se extrajo el agar. Una vez fijadas las monocapas, se procedió a tefirlas agregando una solución de cristal violeta al 1%, que se mantuvo durante 15 minutos. El exceso de colorante fue lavado con agua corriente dejando escurrir antes de contar las placas.

Se utilizaron dos botellas por dilución y los títulos se calcularon en base a la siguiente formula:

Título (UFP/ml) N/VxD

siendo: N: número promedio de placas
V: volumen de inóculo
D: dilución inoculada.

3.5.b. Dilución al punto final.

Se inocularon ratones blancos (Cepa OF₁) de 24 - 48 hs, por vía ic con 0,02 ml de diluciones de la muestra a titular, seriadas al décimo en PBS.

Se utilizaron lotes de 9 ratones por dilución. Estos animales se observaron durante 21 días registrándose la aparición de sintomatología típica producida por el virus Junin.

Los títulos se expresaron DL₅₀/ml calculándolo por el método estadístico de Reed y Muench (1938).

3.6. Obtención de muestras de sangre.

3.6.1. *C. MUSCULINUS* sanos e infectados con 4.000 DL₅₀/ml de virus Junin, cepa IJCl₃ fueron sangrados a través del plexo venoso retroorbitario. Los animales no fueron anestesiados para la obtención de sangre.

Para llevar acabo las valoraciones hematológicas, de glucemias y uremias se extrajo sangre utilizando capilares heparinizados.

El estudio proteico se realizó en sueros de *C. MUSCULINUS*, obtenidos de la siguiente manera: las muestras sanguíneas se dejaron coagular a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 2500 xg durante 15 min. Los sueros se fraccionaron y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

3.6.2. A partir de muestras de sangre venosa humana normal se obtuvieron los sueros correspondiente por el procedimiento mencionado anteriormente. Estos sueros se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

3.7. Determinaciones hematológicas.

Con las muestras de sangre obtenidas se realizaron las determinaciones de : volumen globular, hemoglobina y recuento total y diferencial de leucocitos.

3.7.1. Volumen globular : Se determinó mediante el método de microhematocrito. Se utilizaron tubos capilares heparinizados para la obtención de las muestras sanguíneas. Dichos capilares fueron centrifugados durante 5 min a 12.000 rpm en una microcentrífuga. La relación porcentual entre el volumen de eritrocitos y el volumen total se midió mediante un ábaco (Dacie y Lewis, 1970) .

3.7.2. Hemoglobina : Se determinó utilizando el método colorimétrico de la cianmetahemoglobina (Drabkin y Austin, 1932). Se utilizó un volumen de sangre de 0,02 ml cada 5 ml de reactivo de Drabkin. Se midió la densidad óptica a 540 nm.

3.7.3. Recuento total de leucocitos: Se efectuó por método visual, utilizando la cámara de cuantaglobulos de Neubauer. Las muestras de sangre fueron diluidas en tubo en la proporción de 1:20. El líquido diluyente usado fue ac acético al 2%, coloreado débilmente con violeta de genciana (Dacie y Lewis, 1970).

En el recuento diferencial de leucocitos se utilizó la coloración de May Grünwald - Giensa para teñir los extendidos de sangre. Se contaron 200 elementos en cada extensión de sangre (Dacie y Lewis, 1970).

3.8. Determinaciones de gluemias y uremias.

Los cricétidos sanos e infectados fueron sangrados después de tres hs de ayuno, utilizando capilares heparinizados. Se separó el plasma por centrifugación a 12.000 rpm, durante cinco min en una microcentrífuga.

Los dosajes de gluemias y de uremias se realizaron usando equipos de reactivos comerciales (Wiener, Lab.).

Se determinó el nivel de glucosa en el plasma de cada animal usando el método enzimático de glucosa oxidasa-peroxidasa, colorimétrico (Henry, 1969). Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 505 nm.

Se dosó la concentración plasmática de la urea aplicando el método enzimático específico que utiliza ureasa. Los productos de degradación de la urea fueron medidos colorimétricamente (azul de indofenol) (Stergermann y Loeschecke, 1962). Las densidades ópticas se midieron a una longitud de onda de 540 nm.

3.9. Determinaciones de proteínas séricas totales.

Las proteínas totales se determinaron en sueros provenientes de *C. musculinus* sanos e infectados con la cepa XJCl₃ de VJ. Los cricétidos fueron sangrados después de 3 hs de ayuno. También fueron valorados sueros

humanos normales, obtenidos después de 12 hs de ayuno.

Para la valoración sérica de las proteínas totales se utilizó el método de Lowry et al (1951). La curva de calibración se realizó empleando albúmina bovina, marca comercial BDH.

Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 660 nm.

3.10. Fraccionamiento de proteínas séricas

Los sueros cuyas proteínas totales se valoraron cuantitativamente, fueron sometidos a fraccionamientos electroforéticos.

3.10.a. En acetato de celulosa gelificado.

Para realizar este fraccionamiento proteico se utilizaron tiras de acetato de celulosa (Kohn, 1957) gelificado, comercializado como Cellogel (Chemetron, Milano) de 2,5 x 17 cm; solución reguladora de alta resolución: TRIS 0,116M, glicina 0,301M, ácido salicílico 0,0036M (PH:8,6); una cuba de electroforesis y una fuente de poder estabilizada.

Se sembraron 1,5 µl de cada suero, coloreado con azul bromofenol. Las separaciones electroforéticas se realizaron durante 30 min, utilizando una intensidad de corriente eléctrica de 3 mA/tira y una diferencia de potencial no mayor de 200 V.

Las diferentes bandas proteicas fueron teñidas con solución colorante negro amido 10B 0,1% en solución de (V/V) metanol: ácido acético: agua, 45:10:45, solución lavadora, se descoloraron con la misma solución lavadora. Posteriormente, las tiras de acetato de celulosa se transparentizaron sumergiéndolas primero en metanol puro y luego en una solución de (V/V) metanol: ácido acético: glicerol (86:14:1).

Se efectuó el trazado densitométrico de las diferentes bandas proteicas utilizando un densitómetro marca comercial METROLAB..

3.10.b. En gel de poliacrilamida en placa vertical.

Se utilizó el sistema discontinuo en gel poliacrilamida descrito por Laemmli (1970) para realizar el fraccionamiento proteico.

Cada placa utilizada estaba formada por un gel espaciador con la siguiente composición (P/V) : 3,8% de acrilamida, 0,10% de N,N' Metilen-bis-acrilamida, 0,10% de persulfato de amonio, 0,031% de N,N,N',N'tetrametil-1:2 - diamino etano (TEMED) en solución amortiguadora TRIS-ClH 0,495M (PH 6,8) y por un gel separador compuesto por (P/V): 7,2% de acrilamida, 0,19% de N,N' metilen-bis-acrilamida , 0,036% de persulfato de amonio, 0,031% de TEMED en solución amortiguadora TRIS-CH 3,0 M (PH:8,8).

En cada calle del gel se sembró una muestra de suero, preparado de la siguiente manera : 4 µl de suero + 2 µl de azul de bromofenol, 0,1% en etanol + 5 µl de sacarosa 50%.

Se aplicó un voltaje de 140 V. durante 5 hs usándose como solución reguladora de la separación

electroforética TRIS-ClH 0,0247M, glicina 0,192 M (PH: 8,3).

El gel se tiñó con azul brillante de Coomasie R250 0,1% en solución de (V/V) metanol : agua: ácido acético (50:38:12) y se decoloró con ácido acético al 10%.

- 3.10.c. En dos pasos sucesivos
- 1) Acetato de celulosa
 - 2) Gel de poliacrilamida

Se implementó la siguiente técnica: separación de las proteínas séricas en acetato de celulosa y a continuación las bandas proteicas obtenidas en el soporte mencionado fueron fraccionadas en una placa de gel de poliacrilamida.

1) Separación en acetato de celulosa gelificado.

Se sembraron tres veces consecutivas, en el mismo lugar, 3 µl de suero coloreado con azul de bromofenol, dejando secar el soporte entre las sucesivas siembras.

Se realizó la reparación electroforética en las condiciones descritas anteriormente para el fraccionamiento en acetato de celulosa.

Una vez finalizada la separación proteica, se cortó la tira de acetato de celulosa por la mitad en sentido longitudinal del fraccionamiento proteico. Una de las partes en que se dividió el soporte se colocó en cámara húmeda y la otra porción de la tira se tiñó con solución de Negro Amido 10B 0,1% en solución lavadora. Una vez finalizado el proceso de tinción y lavado, se juntaron ambas tiras de acetato de celulosa en forma tal que se pudo inferir la presencia de las bandas proteicas del acetato de celulosa no teñidas, por comparación visual. De la tira no coloreada se cortaron trozos de acetato de celulosa de aproximadamente 0,5 x 1 cm en las zonas en que se encontraban las distintas bandas proteicas. Los trozos de acetato de celulosa se sembraron en el gel espaciador de una placa horizontal de poliacrilamida.

4 µl de suero total se embebieron en un pedazo de acetato de celulosa de 0,5 x 1 cm y se sembró de idéntica manera que los demás en gel.

2) Gel de poliacrilamida en placa horizontal.

gel de poliacrilamida

- gel espaciador: 3,8% de acrilamida
- gel separador: 7,2% de acrilamida

La composición del gel, las soluciones reguladoras y el proceso de tinción son los mismos que se describieron previamente para la placa de poliacrilamida vertical.

Preparación de la placa de gel de poliacrilamida

Se utilizaron dos láminas de vidrio de 16 x 13 cm. A una de ellas se adhirió un trozo de celofán hidrófilo hidratado de 18 x 15 cm bien tensado. Entre ambas placas de vidrio se colocaron tres separadores plásticos de 1 mm de espesor por 1 cm de ancho.

Los separadores se colocaron en forma tal que encuadraron un espacio de 10 x 10 cm. Una vez acomodado y prensado todo el dispositivo, se procedió a sellar las láminas de vidrio con agar al 2%. El soporte armado se colocó verticalmente, de modo que quedó el lado sin sellar hacia arriba. Se volcó dentro la solución polimerizante del gel separador hasta que alcanzó una altura de 7 cm. Se dejó polimerizar (aproximadamente una hora), luego se agregó la solución correspondiente al gel espaciador hasta que alcanzó una altura de 2 cm. A los 40 - 45 min se obtuvo un gel de aproximadamente 10 x 9 cm (gel espaciador: 2 cm - gel separador: 7 cm).

Se guardó la placa de poliacrilamida contenida entre las dos láminas de vidrio, en cámara húmeda durante 24 hs.

Se removió el vidrio superior, colocando una espátula entre ambas placas de vidrio y se recortó y retiró el celofán con el gel adherido.

La placa de poliacrilamida junto con el papel celofán, se apoyaron en un soporte sólido, colocado horizontalmente entre ambos separadores de los compartimientos anódico y catódico de una cuba de electroforesis estándar. Se utilizó papel secante como puente entre el gel y la solución reguladora.

El fraccionamiento proteico se realizó durante 2 hs, aplicando una intensidad de corriente de 20 mA y una diferencia de potencial de 200 V.

La separación electroforética se interrumpió 1 hora después de iniciada, por un tiempo mínimo, para retirar los trozos de acetato de celulosa del gel.

3.11. Obtención de antisueros: suero de conejo, antisuero de *Calomys musculinus*.

Se inocularon dos conejos New Zeland White, con una mezcla de sueros provenientes de 20 cricétidos adultos (machos y hembras) por vía intra-muscular. Uno de los conejos fue inoculado con suero total de *C. musculinus* (conejo N°157, macho) y el otro con la fracción del suero de *C. musculinus* que se obtiene, después de precipitarlo dos veces con sulfato de amonio al 50% (conejo N° 167, hembra).

3.11.a. Método usado para la precipitación del suero de *Calomys musculinus* con sulfato de amonio.

Se trabajó con material de vidrio estéril, cuidando de mantener la esterilidad en cada paso realizado.

3.11.b. Preparación del inóculo.

Se inocularon los antígenos (suero total de *C. musculus* y suero fraccionado con $SO_4(NH_4)_2$ al 50% según se detalla a continuación: el antígeno se diluyó 1/4 con solución fisiológica estéril. 0,5 ml de esta dilución se emulsionaron muy bien con 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund (marca comercial BACTO).

3.11.c. Esquema de la inoculación realizada.

Los conejos fueron inoculados por vía intra-muscular (i m) a intervalos de 10-12 días durante tres meses. Se utilizó antígeno total para inocular el conejo NQ157 y antígeno fraccionado, para el conejo NQ167. Luego de siete inoculaciones, se llevó a cabo una sangría exploratoria, por punción en la vena marginal de la oreja.

Se obtuvo un título de 1/32 en el suero del conejo NQ157 y de 1/4 en el suero del conejo NQ167, valorados por el método de Ouchterlony (1967).

Los conejos fueron reestimulados nuevamente por vía i m, utilizando el mismo antígeno y dosis para cada uno de ellos.

Después de 10 días fueron sangrados por punción cardíaca. La sangre extraída se fraccionó en tubos cónicos estériles, los cuales fueron taponados y colocados en un baño de agua a 37 °C, durante 4 hs. Luego se centrifugaron a 2.500 x g durante 30 min. El suero así obtenido se fraccionó estérilmente y se conservó a -20 °C.

3.12. Inmunolectroforesis en gel de agar

Se utilizó el método descrito por Grabar y Williams (1953), adaptado como micrométodo por Scheidegger (1955), modificado, para realizar las inmunolectroforesis de sueros provenientes de *C. musculus* sanos e infectados con la Cepa XJCl₃ de VJ.

Como soporte se utilizaron porta objetos de 75 x 25 mm. cubiertos con una película seca de agar base 0,5% en agua destilada. Sobre los mismos se colocaron aproximadamente 4 ml de agar (Noble Especial de Difco Laboratories) 1,5% en solución reguladora de alta resolución: TRIS 0,116M, glicina 0,301M, ácido salicílico 0,0036M (pH:8,6).

En el gel de agar que cubría cada porta objeto, se cortó una canaleta longitudinal central de 2 mm de ancho y 65 mm de longitud.

A cada lado de la misma se hicieron dos orificios de 1 mm de diámetro ubicados en el centro del porta objeto y una distancia de 5 mm del borde externo de la canaleta central. En cada orificio se sembraron 5 µl de muestra de suero, coloreado con azul de bromofenol 0,5% en etanol.

La separación electroforética se realizó durante una hora, aplicando una intensidad de corriente de 5 mA por porta objeto y un voltaje no superior a 200 V; se utilizó solución reguladora de alta

resolución.

Finalizada la separación electroforética, se retiró la porción de agar de la canaleta central y se colocaron 80 μ l de antisuero, antiproteínas séricas de *C. musculus*. Se colocaron los porta objetos en cámara de humedad durante 24 hs. Luego se eluyeron las proteínas no precipitadas con solución de cloruro de sodio 0,9% en agua, durante 72 hs, renovando la solución de lavado cada 24 hs.

Se secaron los geles de agar en estufa a 80 °C, durante 30 min y se tizaron con solución Negro Amido 10B 0,5% en solución de (V/V) metanol: ácido acético: agua (45:10:45). (solución lavadora). Se descoloraron con la solución lavadora.

3.13. Diseño experimental.

Se inocularon grupos de *C. musculus* de dos a cuatro días de edad por vía intraperitoneal (ip), con 4.000 DL₅₀/ml de virus Junin, cepa XJCl₃.

Estos animales y sus controles fueron agrupados de la siguiente manera:

GRUPO I

Constituido por 243 animales inoculados, 86 animales fueron sacrificados a los 2-2-5-5-4-1-1-10-1-2-1-1-2-1-3-1-3-1-1-2-4-1-2-2-4-1-3-2-1-2-2-1-1-4-2-1-1-1-2 días post infección para realizar la titulación de virus presente en el cerebro. El número de animales sacrificados en cada uno de los días mencionados fue: 2-2-5-5-4-1-1-10-1-2-1-1-2-1-3-1-3-1-1-2-4-1-2-2-4-1-3-2-1-2-2-1-1-4-2-1-1-1-2.

GRUPO II

Constituido por 190 animales inoculados. Fueron sangrados a los 6-8-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-21-22-23-24 días post infección (dpi).

En las 83 muestras de sangre obtenidas se realizaron las determinaciones hematológicas. El número de muestras obtenidas en cada uno de los días mencionados fue 4-3-2-5-12-6-2-2-8-9-11-1-6-3-3-6.

GRUPO III

Control del grupo II, constituido por 72 animales sanos.

Fueron sangrados a los 9-11-14-15-16-17-18-19-20-21-24-30 días de vida.

En las 60 muestras obtenidas se realizaron las determinaciones hematológicas. El número de muestras analizadas en cada uno de los días mencionados fue: 3-2-8-3-6-6-2-6-9-5-7-3.

GRUPO IV

Constituido por 95 animales inoculados. Fueron sangrados a los 10-13-14-18-23-28 dpi. En las muestras de sangre se dosó el nivel de glucosa y de urea.

Glucemias: Se procesaron 47 muestras de sangre. El número de determinaciones realizadas en cada uno de los días post-infección fue : 9-9-7-5-12-5.

Uremias: Se procesaron 36 muestras sanguíneas. El número de determinaciones realizadas en cada uno de los dpi mencionados fue 4-5-6-7-7-7.

GRUPO V

Control del grupo IV. Constituido por 68 animales sanos.

Fueron sangrados a los 13-15-17-21-27-31 días de vida. Las muestras sanguíneas se utilizaron para determinar glucemias y uremias.

Glucemias: Se procesaron 61 muestras sanguíneas. La cantidad de determinaciones realizadas en cada uno de los días citados fue: 8- 12-10-10-13-8.

Uremias: Se analizaron 34 muestras de sangre. La cantidad de determinaciones realizadas en cada uno de los días citados fue: 3-6-6-6-7-6.

GRUPO VI

Constituido por 254 animales inoculados. En las muestras sanguíneas provenientes de estos animales se realizaron determinaciones hematológicas, de glucemias y de uremias.

Valoraciones hematológicas:

Los animales fueron sangrados a los 38-42-45-89-97-116-123-126-130-138-139-158-172-180-186-196-217-225-236-243-244-269-287-288-315-442-443-493-497-536-572 dpi.

Se obtuvieron 84 muestras sanguíneas.

La cantidad de determinaciones realizadas en cada uno de los días citados fue: 1-4-4-6-4-2-3-3-3-4-1-1-1-1-5-5-4-1-1-7-2-1-1-1-1-3-1-1-4-3-5.

Glucemias: Los animales fueron sangrados a los 43-48-56-61 dpi.

Se obtuvieron 20 muestras de sangre. La cantidad de determinaciones en cada uno de los días mencionados fue : 6-4-5-5.

Uremias: Los animales fueron sangrados a los 33-40-46-50-55-66 dpi. Se obtuvieron 36 muestras de sangre. La cantidad de determinaciones realizadas en cada uno de los días mencionados fue: 4-8-6-7-5-6.

GRUPO VII

Control del grupo VI. Constituido por 158 animales sanos.

En las muestras sanguíneas se realizaron determinaciones hematológicas de glucemias y de uremias.

Valoraciones hematológicas. Los animales fueron sangrados a los 40-48-56-63-84-103-120-126-128-150-171-230-270-276-312-338-575 días de vida. Se obtuvieron 95 muestras sanguíneas. El número de determinaciones hematológicas en cada uno de los días mencionados fue : 3-4-6-4-7-4-7-19-3-6-7-4-3-1-5-5.

Glucemias: Los animales fueron sangrados a los 45-50-58-63 días de vida. Se obtuvieron 18 muestras de sangre. El número de determinaciones en cada uno de los días mencionados fue : 5-4-4-5.

Uremias: Los animales fueron sangrados a los 35-42-48-52-57-68 días de vida.

Se obtuvieron 35 muestras de sangre. En las cuales se realizaron determinaciones de urea. El número de determinaciones en cada uno de los días mencionados fue : 6-6-5-5-8-5.

GRUPO VIII

Constituido por 65 animales inoculados. Fueron sangrados a los 15-18-20-21-22 dpi. Se obtuvieron 22 muestras sanguíneas en las cuales se valoraron las proteínas totales y se realizó el fraccionamiento proteico utilizando como soporte acetato de celulosa gelificado. La cantidad de determinaciones realizadas en cada uno de los días citados fue: 8-4-4-2-4.

GRUPO IX

Control del grupo VIII. Constituido por 36 animales sanos.

Fueron sangrados a los 17-18-21-25-30 días de vida.

Se obtuvieron 23 muestras sanguíneas de las cuales se valoraron las proteínas totales y se realizó el fraccionamiento proteico en acetato de celulosa. La cantidad de determinaciones realizadas en cada uno de los días citados fue: 3-3-3-4-10.

GRUPO X

Constituido por 75 animales inoculados. Se obtuvieron 47 muestras sanguíneas que se utilizaron para valorar las proteínas totales y realizar el fraccionamiento de las proteínas séricas en gel de poliacrilamida.

Los animales fueron sangrados a los 15-18-19-21-23-45-55-60-70-90 dpi. El número de muestras procesadas en cada uno de los días mencionados fue 4-5-4-3-4-5-5-6-5-6 respectivamente.

GRUPO XI

Control del grupo X, constituido por 38 animales sanos. 18 cricétidos fueron inoculados a los 2-4 días de vida con 0,02 ml de una solución 10% P/V de un homogeneizado de cerebro de ratón blanco lactante normal (CRBN, control I) y los 20 cricétidos restantes se utilizaron como controles sanos (control II).

Los animales controles I y II fueron sangrados a los 17-21-23-26-27-30-35-45-48-58-62-72-100 días de vida. El número de muestras sanguíneas obtenidas en cada uno de los días mencionados fue:

Control I: 2-2-3-2-3-1-1-1-2-2-3-2. Total 24 muestras sanguíneas.

Control II: 3-2-2-3-2-1-1-1-2-3-3-4. Total 27 muestras de sangre.

GRUPO XII

Constituido por 132 animales inoculados. Se obtuvieron 49 muestras sanguíneas cuyas proteínas séricas totales fueron valoradas y en las mismas muestras se realizó el estudio inmunolectroforético. Los animales fueron sangrados a los 10-16-19-21-31-38-47-69-71-76 dpi. La cantidad de determinaciones realizadas en cada uno de los días citados fue: 5-7-7-11-4-1-4-3-4-3.

GRUPO XIII:

Control del grupo XII. Constituido por 27 animales sanos. 15 cricétidos fueron inoculados a los 2-4 días de vida con 0,02 ml de una solución (P/V) 10% de un homogeneizado de cerebro de ratón blanco normal (CRBN,

Control I) y los 12 cricétidos restantes se utilizaron como control sano (control II).

Se obtuvieron 20 muestras sanguíneas del control I, en los días 15-20-25-34-46 de vida. La cantidad de muestras obtenidas en cada día fue: 6-4-1-4-5.

Se procesaron 21 muestras sanguíneas del control II, que fueron obtenidas en los días 17-18-21-25-73-78 de vida. La cantidad de muestras obtenidas en cada día citado fue 3-3-3-4-3-5.

Las muestras provenientes de los controles I y II se utilizaron para realizar las valoraciones de las proteínas totales y el estudio inmunolectroforético de las mismas.

Los animales inoculados en el momento de tomar las muestras presentaron en algunos casos signos evidentes de enfermedad, mientras que otros aparentaban estar sanos.

Los datos de los valores hematológicos, de glucemias, de uremias y de proteínas séricas provenientes de los animales inoculados a los 2-4 días de edad, fueron comparados con sus controles correspondientes teniendo en cuenta la edad del animal en el momento de la obtención de la muestra.

3.14. Métodos estadísticos.

Estudio de la distribución para cada una de las variables.

Estudio de su ajuste a la distribución normal. Análisis de la varianza de un factor aplicado a los datos hematológicos, a los valores de glucemias, de uremias y de proteínas provenientes de animales infectados y sus respectivos controles.

Técnica no paramétrica o de distribución libre (percentiles) aplicada a la relación linfocitos/neutrófilos (L/N) de animales sanos para establecer el intervalo de referencia (IFCC, 1988).

4 - RESULTADOS

4.1. VALORACIONES HEMATOLOGICAS EN *Calomys musculinus* NORMALES.

Se estudiaron los parámetros hematológicos de *C.musculinus* sanos, cuyas edades variaron entre 9 y 575 días.

Debimos analizar animales normales porque necesitábamos tener valores de referencia que fueran comparables con los obtenidos bajo el efecto de la infección viral. Cuando comenzamos la investigación no había bibliografía respecto a los valores hematológicos normales.

Establecimos como límite inferior para nuestras valoraciones 9 días de edad, tanto para los animales sanos como para los infectados. Nuestras primeras exploraciones nos indicaron que no había variabilidad hematológica entre animales sanos e infectados en etapas más tempranas y nos resultaba muy dificultoso manipular animales tan pequeños para realizar la punción retroocular.

Como el virus Junin establece infección persistente en el *C.musculinus* (Laguens et al., 1982b), decidimos estudiar este modelo experimental hasta el año y medio de vida aproximadamente, para poder relacionar los parámetros hematológicos con la evolución de la infectividad viral previamente descrita (Lampuri, 1984).

Por las razones expuestas anteriormente se eligió el rango de edad en 9-575 días.

4.2. DETERMINACION DEL VOLUMEN GLOBULAR.

Se eligió el volumen globular para realizar las pruebas estadísticas porque es la valoración hematológica determinada con mayor exactitud por muestra metodología de trabajo.

Se estudió la determinación del volumen globular en animales sanos, cuyas edades variaron entre 9 y 575 días. Se presentan los datos hallados experimentalmente.

CUADRO Nº 2

Edad días	VARIABLE - VOLUMEN GLOBULAR	n	X	S
9	43-46-44	3	44,3	1,52
11	43-45	2	44,0	1,41
14	46-40-42-44-43-45-46-45	8	43,8	2,10
15	43-44-43	3	43,3	0,57
16	47-44-40-46-39-46	6	43,6	3,38
17	48-45-44-45-42-42	6	44,3	2,25
19	50-45-34-42-46-48	6	44,1	5,67
20	50-47-47-47-43-41-44-47-44	9	45,5	2,74
21	38-39-38-36-39	5	38	1,22
24	43-43-40-44-37-40-42	7	41,3	2,42
30	49-43-44	3	45,3	3,21
40	48-49-50	3	49	1,00
48	47-50-52-49	4	49,5	2,08
56	49-51-53-48-45-50	6	49,3	2,73
63	51-48-45-52	4	49	3,16
84	49-51-48-48-49-46-44	7	47,8	2,26
103	46-55-52-51	4	51	3,74
120	51-54-52-50-52-49-49	7	51	1,82
126	53-49-52-48-51-44-48	7	49,3	3,03
128	46-50-49-43-44-47-47-48-48-50-54 47-48-50-50-49-46-50	18	48,1	2,54
150	50-52-49	3	50,3	1,52
171	50-50-43-44-47-51	6	47,5	3,39
230	49-41-43-45-45-41-47	7	44,4	3,00
270	45-45-48-50	4	47,0	2,44
276	46-45-48	3	46,3	1,52
312	46	1	46	46
338	44-50-48-48-47	5	47,4	2,19
575	47-49-44-46-43	5	45,8	2,38

Comentarios de los resultados del cuadro n° 2.

Sin realizar los cálculos estadísticos se observa un valor medio ($\bar{X} = 43,4\%$). Homogéneo entre los animales 9 y 30 días de edad. Este valor se incrementa entre los animales de 40 a 160 días ($\bar{X} = 49,1\%$) y cambia en el período de 170 - 575 días de vida ($\bar{X} = 46,3\%$).

4.2.1. Distribución de frecuencias de los datos hallados.

Agrupamiento en clases.

Se realizó el estudio de la distribución de la variable, para decidir si los datos del volumen globular obtenidos de animales sanos (edad entre 9 y 575 días) corresponden a única población. Para llevar a cabo el mismo se ordenaron los datos por orden de magnitud. Se eligió un intervalo de clase de 2,2 unidades y se calcularon los límites de cada uno de los mismos. Dentro de cada intervalo de clase se ubicó la frecuencia (f) de cada valor. Cada clase quedó identificada por la marca de clase o sea, por punto medio del intervalo correspondiente. La frecuencia acumulada (F) de cada marca de clase se obtuvo sumando las f de los intervalos anteriores.

El agrupamiento en clases realizado con los datos del volumen globular se presenta en el cuadro N° 3.

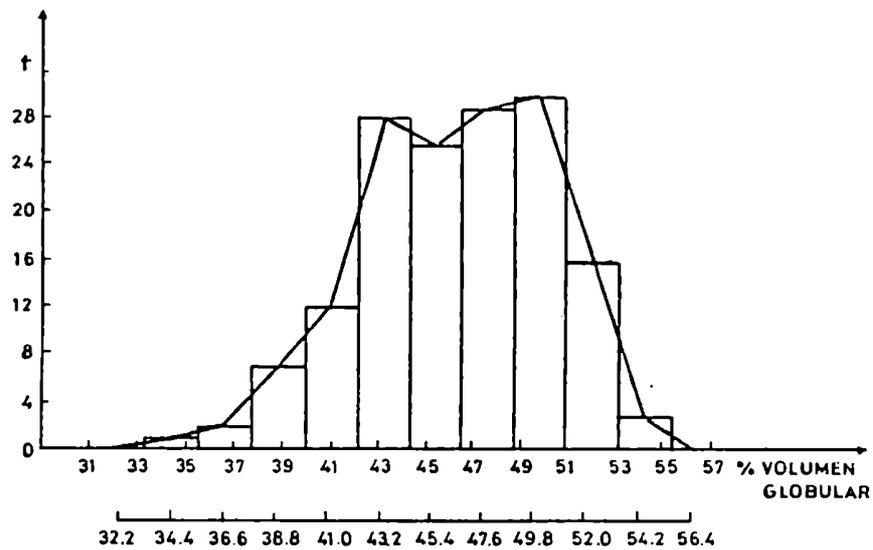
CUADRO NQ 3

Intervalo	mi	fi	F
[33,3-35,5]	34,4	1	1
[35,5-37,7]	36,6	2	3
[37,7-39,9]	38,8	5	8
[39,9-42,1]	41,0	12	20
[42,1-44,3]	43,2	28	48
[44,3-46,5]	45,4	26	74
[46,5-48,7]	47,6	29	103
[48,7-50,9]	49,8	30	133
[50,9-53,1]	52	16	149
[53,1-55,3]	54,2	3	152

La representación gráfica de la distribución de frecuencias realizada se muestra en la figura NQ 1, donde hemos representado el histograma y el polígono de frecuencia de los datos.

Histograma y polígono de frecuencia de los datos hallados en la determinación del volumen globular

FIGURA NQ 1



En la figura nQ1 se ha representado la distribución de frecuencias obtenida con todos los datos de la determinación del volumen globular, agrupadas en 10 clases de intervalo: 2,2 unidades .

El eje de las abscisas muestra las marcas de clase para la distribución de frecuencias agrupadas.

La observación del histograma (fig. NQ 1) sugiere la existencia de una distribución multimodal, que en este caso se debe al hecho de no haberse considerado una partición por edad.

Decidimos dividir la población en estudio en tres grupos, teniendo en cuenta la edad. Se la agrupa tentativamente en periodos de 9 a 30, 40 a 160 y 170 a 575 días, de acuerdo con lo que resulta de observar los datos de los valores promedios (\bar{X}) de esos periodos. (Cuadro NQ 2).

CUADRO NQ 4

Primer período: 9 - 30 días de edad, datos agrupados

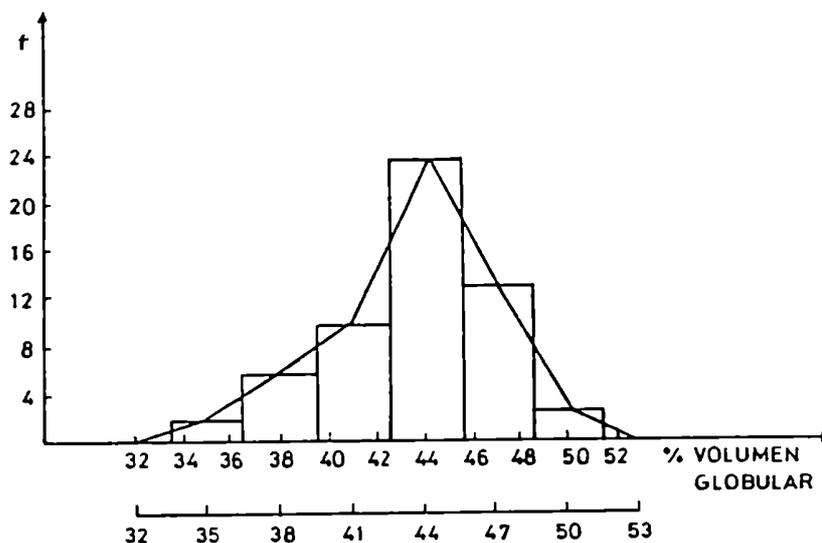
Intervalo	mi	fi	F
[33,5-36,5]	35,0	2	2
[36,5-39,5]	38,0	6	8
[39,5-42,5]	41,0	10	18
[42,5-45,5]	44,0	24	42
[45,5-48,5]	47,0	13	55
[48,5-51,5]	50,0	3	58
$\bar{X} = 43,4\%$ $s = 3,37\%$			

\bar{X} y s corresponden a los datos obtenidos en el período 9-30 días de edad.

Los datos agrupados según el cuadro NQ 4 están representados en la figura NQ 2.

Histograma y polígono de frecuencias para el
período 9-30 días de edad

FIGURA NQ 2



El histograma y el polígono de frecuencias obtenido con los datos agrupados en el cuadro NQ 4, muestran una forma de distribución normal.

Segundo período: 40 - 160 días de edad, datos agrupados

Para el segundo período se realiza el mismo procedimiento que para el primero, para calcular la distribución de frecuencias y su representación gráfica.

CUADRO Nº 5

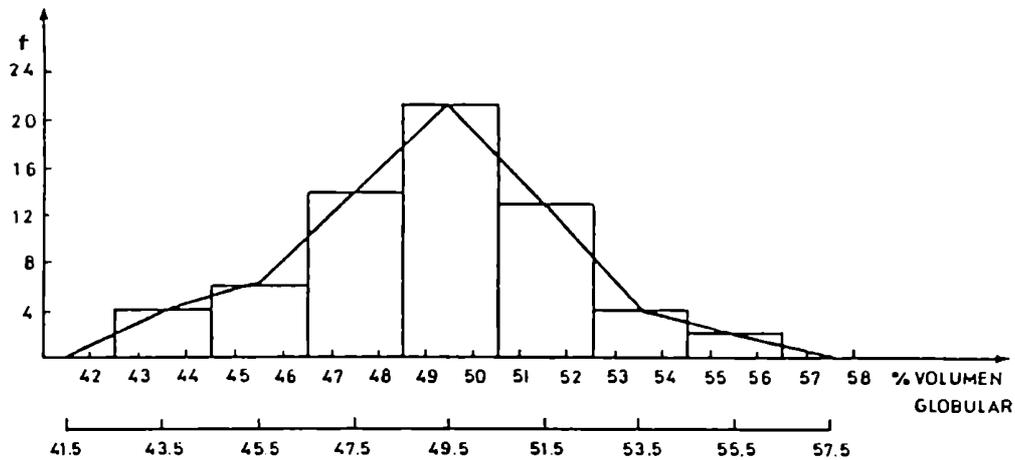
Intervalo	mi	fi	F
[42,5-44,5]	43,5	4	4
[44,5-46,5]	45,5	6	10
[46,5-48,5]	47,5	14	24
[48,5-50,5]	49,5	21	45
[50,5-52,5]	51,5	13	58
[52,5-54,5]	53,5	4	62
[54,5-56,5]	55,5	1	63
$\bar{x} = 49,1\%$ $s = 2,65\%$			

\bar{x} y s corresponden a los datos obtenidos en el período 40 - 160 días de edad.

Los datos agrupados según el cuadro Nº 5 están representados en la figura Nº 3.

Histograma y polígono de frecuencias para el
período 40 - 160 días de edad

FIGURA Nº 3



El histograma y el polígono de frecuencias obtenidos al graficar los datos agrupados del cuadro Nº 5, muestran una distribución normal.

En los dos primeros grupos (Cuadros 4 y 5 y figuras 2 y 3), se estudió la normalidad aplicando el método de Probits (Sokal y Rohlf, 1969) y se concluyó que existe un buen ajuste a la distribución normal en ambos casos.

Tercer período: 170 - 575 días de edad, datos agrupados

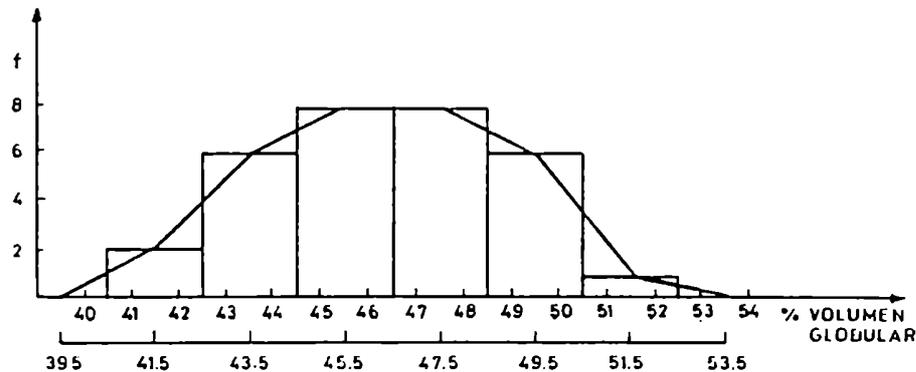
CUADRO Nº 6

Intervalo	mi	fi	F
[40,5-42,5]	41,5	2	2
[42,5-44,5]	43,5	6	8
[44,5-46,5]	45,5	8	16
[46,5-48,5]	47,5	8	24
[48,5-50,5]	49,5	6	30
[50,5-52,5]	51,5	1	31
$\bar{X} = 46,3\%$			
$s = 2,70\%$			

\bar{X} y s corresponden a los datos obtenidos en el período 170 - 575 días de edad.

Histograma y polígono de frecuencia para el
período 170 - 575 días de edad

FIGURA Nº 4



El histograma y el polígono de frecuencias obtenido cuando se graficaron los datos del cuadro Nº 6, muestran una distribución normal.

Para el tercer período (cuadro Nº 6, figura Nº 4) también se estudió su distribución comprobándose la normalidad por el método de Rankits (Sokal y Rohlf, 1969), debido a que se dispone de pocos datos. En este caso también se observó un buen ajuste a la distribución normal.

Mediante el test de Barlet (Sokal y Rohlf, 1969), comprobamos que existe homogeneidad entre las varianzas de los tres grupos. El cumplimiento de este requisito es necesario para continuar el estudio utilizando el método de análisis de la varianza.

Para decidir si efectivamente la separación en grupos fue adecuada y comprobar la existencia de diferencias entre las medias de los tres grupos, se aplicó, como hemos mencionado, un análisis de la varianza.

Mediante el citado método, verificamos que al nivel 0.01 existe diferencia significativa entre las medias de los tres períodos. Al realizar las comparaciones de a pares, se comprobó que siempre hay diferencias entre las medias, lo que confirma lo adecuado de la partición.

4.3. VALORES HEMATOLOGICOS DE *Calomys musculinus* NO INFECTADOS OBTENIDOS DURANTE EL PERIODO 9 - 575 DIAS DE VIDA.

Los datos hematológicos fueron agrupados en base a los resultados obtenidos del estudio estadístico realizado a la determinación del volumen globular. Los mismos indican que es adecuado dividir la población en 3 grupos etarios: 9-30; 40-160; 170-575 días. (cuadro N^o 7).

Valores hematológicos de *Calomys musculinus* no infectados
(9-575 días de edad)

CUADRO Nº 7

	PERIODO 9-30 días de edad		PERIODO 40-160 días de edad		PERIODO 170-575 días de edad	
	Nº de roedo- res	variable	Nº de roedo- res	variable	Nº de roedo- res	variable
Volumen globular%	58	43,4 ^a 34-50 ^b	63	49,1 43-55	31	46,3 41-50
Hemoglobina mmol/L	58	8,12 6,20-9,92	55	9,36 7,63-11,80	30	9,16 8,06-10,23
Leucocitos x 10 ⁹ /l	56	4,10 1,50-9,00	60	6,30 2,50-13,50	24	4,90 1,50-8,80
Neutrófilos%	60	21,40 8,50-38,50	64	15,60 8,00-33,00	31	19,66 8,50-35,00
Linfocitos%	60	77,00 60,50-90,50	64	80,50 55,50-91,50	31	74,70 58,00-88,00
Eosinófilos %	60	1,19 0-6,50	64	3,10 0-11,00	31	4,0 0,5-13,5
Monocitos %	60	0,37 0-2,50	64	0,68 0-3,00	31	1,10 0-3,5
Basófilos %	60	0	64	0	31	0

a) Valores medios (\bar{Y}) obtenidos de cada variable.

b) Rango de la variable.

Observando los datos presentados en el cuadro NQ 7, concluimos que los cricétidos del primer período (9 - 30 días de edad) poseen los valores medios (\bar{X}) más bajos en las determinaciones de volumen globular, hemoglobina y recuento de leucocitos. Los máximos valores medios se alcanzan en el período 40 - 160 días de vida y luego estos declinan conforme avanza la edad del animal (3er. período).

Valores hematológicos registrados en otros roedores (Finch y Foster, 1973; Weisse et al., 1974; Frith et al., 1980; Leonard y Ruben, 1986), también muestran variaciones con la edad. Una vez establecidos los grupos etarios para los valores de referencia de las determinaciones hematológicas en nuestra colonia de *C. musculus*, comenzamos con el estudio del efecto de la infección experimental con virus Junin, Cepa XJCl₃.

4.4 HEMATOLOGIA DEL *Calomys musculus* INFECTADO.

4.4.1 Evolución de la infección.

La infección experimental del *Calomys musculus* con la cepa atenuada XJCl₃ produce una respuesta variable según la edad del animal. Así los cricétidos perinatalmente infectados desarrollan una enfermedad que cursa en dos etapas, una aguda y otra crónica que han sido caracterizadas por distintos investigadores (Lampuri et al., 1982; Laguens et al., 1982 b; Lampuri, 1984; Alché et al., 1985; Coulombié et al., 1986).

En la figura NQ 5 se muestran los resultados que obtuvimos cuando se realizó la búsqueda de virus en los cerebros de cricétidos inoculados perinatalmente con virus Junin y sacrificados a distintos días pi.

Los datos graficados en la figura NQ 5 se obtuvieron a partir de cricétidos neonatos, inoculados con 4000 DL₅₀/ml de virus Junin, Cepa XJCl₃ por vía ip (grupo I). Los animales fueron sacrificados desde el día 2 hasta el día 350 pi.

A causa de la infección inducida experimentalmente, se produce

una mortalidad mayor al 50% durante la fase aguda de la enfermedad (Lampuri et al., 1982).

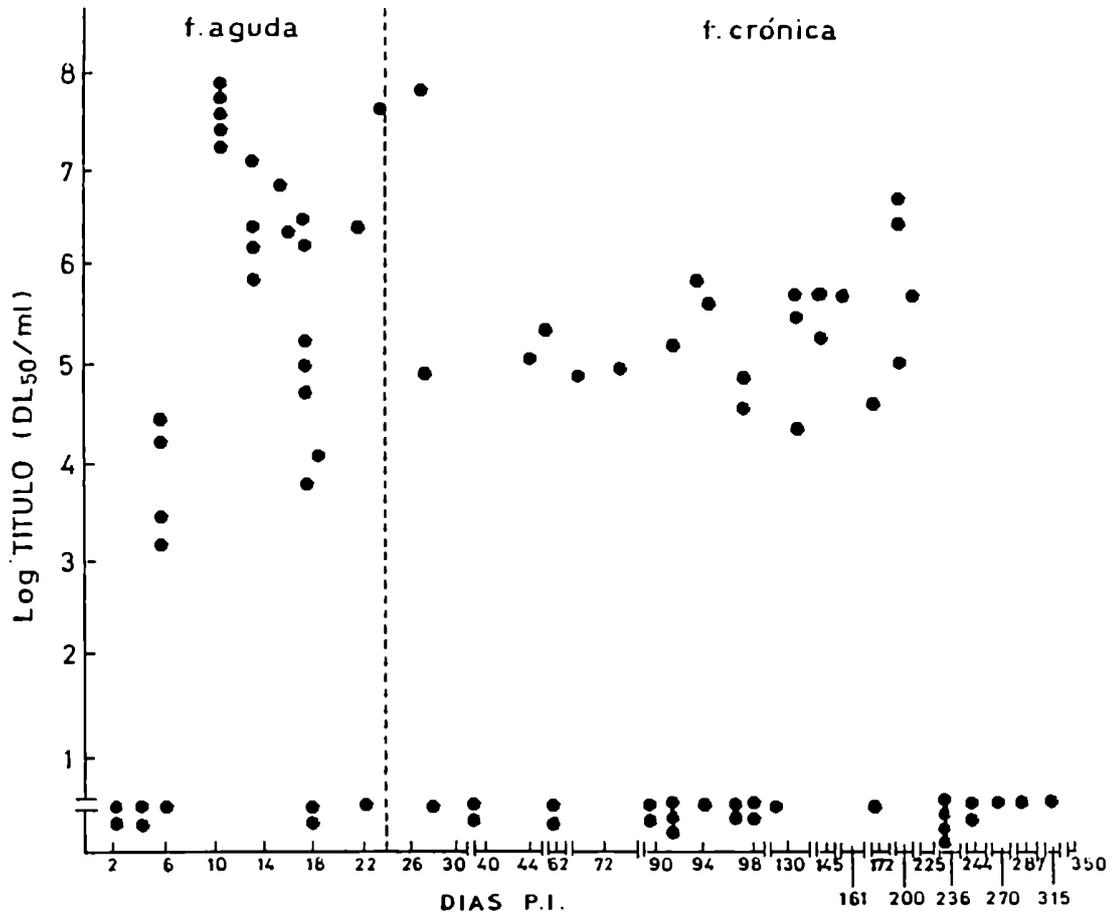
Al 60 día se encuentran títulos significativos de virus, mientras que los títulos máximos cercanos de 10^8 DL₅₀/ml. se alcanzan a los 11 días pi. A partir de ese día se observa una declinación en los títulos, sin embargo a los 28 dpi, dos de los tres animales sacrificados muestran alto título, indicando el establecimiento del estado crónico.

Se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes en todos los animales sacrificados a partir del día 11 pi, aun en los cuatro animales sacrificados a los días 18,22,28 p i (Fig 5) y que no presentaron virus en el cerebro. (Lampuri, 1984).

Estos resultados que confirman datos anteriores (Lampuri et al., 1982) y los estudios morbilidad y anatomopatológicos (Lampuri, 1984) muestran que el período agudo de la enfermedad, en el que se produce activa multiplicación viral, ocurre entre 60 y 240 día pi.

Cabe señalar que se encontraron títulos virales significativos en el 76% de los animales sacrificados en el período 6 - 24 pi.

FIGURA Nº 5



Se inocularon *Calomys musculus* neonatos con 4000 DL₅₀/ml de virus Junin, Cepa XJC13. Los animales fueron sacrificados a distintos días pi y el título de virus en cerebro fue determinado por inoculación a ratones blancos lactantes. Cada (·) representa el valor hallado en un cricétido inoculado.

4.4.2. Efecto de la infección sobre los parámetros hematológicos.

Etapa aguda.

De acuerdo con los resultados obtenidos con los animales sanos, se trabajó con los roedores en el período 9 - 30 días, inoculándolos a los 2 - 4 días de vida. Este período coincide con la etapa aguda de la enfermedad.

Los resultados se obtuvieron utilizando los animales del grupo II. El cuadro N° 8, muestra los valores medios (\bar{X}) de cada parámetro hematológico estudiado, correspondiente al lote de animales infectados y a su grupo control (grupo II). A su vez están indicados los valores máximos y mínimos de cada determinación sanguínea encontrados tanto dentro de la población normal como de la infectada.

Estos resultados muestran que el valor del volumen globular, la concentración de la hemoglobina y los recuentos de leucocitos y de eosinófilos son prácticamente idénticos para los dos grupos de cricétidos estudiados. En cambio los valores porcentuales de linfocitos, neutrófilos y monocitos difieren significativamente de los controles correspondientes. El cálculo de los valores absolutos de linfocitos, neutrófilos y monocitos provenientes de cada uno de los animales sanos e infectados y la comparación estadística señala la existencia de linfopenia, neutrofilia y de moderada monocitosis.

Dado que los valores medios de linfocitos y de neutrófilos son indicativos de una tendencia pero no reflejan las variaciones individuales de la población, en la fig. N° 6, se muestra la relación linfocitos/neutrófilos (L/N) para los animales infectados.

En la misma figura está representado el intervalo de referencia de la relación L/N en la población normal que tiene un valor de 11,220 - 1,575 dentro del cual están comprendidos el 95% de los valores de referencia del índice L/N.

Este valor permite asegurar que aproximadamente el 40% de los índices correspondientes a los animales infectados se ubican por

debajo del valor límite inferior (1,575). De lo cual inferimos que aproximadamente el 40% de los animales presentan linfopenia y a su vez neutrofilia.

La linfopenia y concordantemente la neutrofilia comienzan a partir de los 8 dpi, la máxima alteración se establece alrededor del día 19 dpi, estas modificaciones no se observan hacia el día 24 pi.

No se observaron modificaciones en la morfología de los eritrocitos y de los leucocitos de los animales infectados respecto de los controles correspondientes.

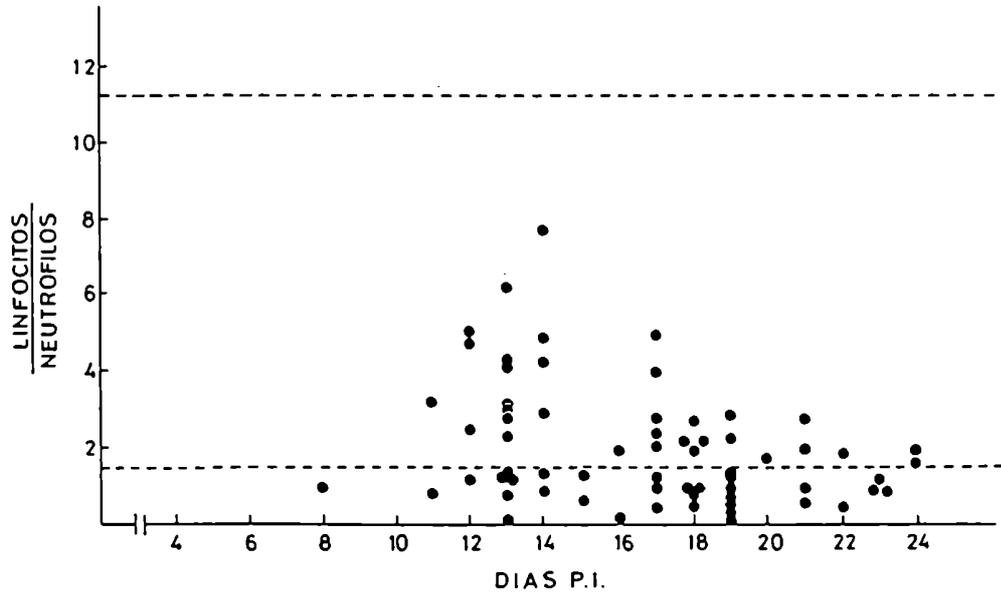
CUADRO Nº 8

Valores hematológicos de *Calomys musculinus* infectados y controles
 Etapa aguda. (Período 9 - 30 días de edad)

	CONTROLES ⁽¹⁾		INFECTADOS ⁽²⁾		D
	Nº de Cricétido	variable	Nº de Cricétido	variable	
Volumen globular%	58	43,4 ^a 34-50 ^b	69	44,0 36-55	NS
Hemoglobina mmol/L	58	8,12 6,20-9,92	45	7,88 6,20-10,23	NS
Leucocitos x 10 ⁹ /l	56	4,10 1,50-9,00	79	4,10 1,10-9,90	NS
Neutrófilos%	60	21,40 8,50-38,50	83	34,10 9,50-80,50	P<0,01
Linfocitos%	60	77,00 60,50-90,50	83	63,00 6,00-90,50	P<0,01
Eosinófilos %	60	1,19 0-6,50	83	1,61 0-10,00	NS
Monocitos %	60	0,37 0-2,50	83	1,38 0-4,50	P<0,01
Basófilos %	60	0	83	0	
Neutrófilos x 10 ⁹ /l	56	0,88 0,12-3,42	79	1,64 0,08-6,63	0,005<P<0,01
Linfocitos x 10 ⁹ /l	56	3,13 0,96-6,78	79	2,34 0,21-5,61	P<0,001
Monocitos x 10 ⁹ /l	56	0,014 0-0,142	79	0,055 0-0,564	0,05<P<0,1

- 1 - Valores medios (\bar{X}) obtenidos de *Calomys musculinus* sanos, de 9 - 30 días de edad.
 2 - Valores medios (\bar{Y}) obtenidos de *Calomys musculinus* infectados, durante el período 6 - 24 dpi (9 - 28 días de edad).
 a - Valores medios (\bar{X}) obtenidos de cada variable.
 b - Rango de la variable.
 D - Diferencias entre animales infectados y no infectados.
 NS - Diferencias no significativas.

FIGURA Nº 6



Cada (·) representa la relación linfocitos/neutrófilos (L/N) de cada cricétido infectados perinatalmente con virus Junin, Cepa NJCl₃ en distintos días post infección. Las líneas (- - -) representan el intervalo de referencia 11,220 - 1,575 hallado en la población normal.

4.4.3. Valoraciones hematológicas.

Etapa crónica.

Como se comentó anteriormente, en la figura NQ 5 se puede observar que los títulos máximos de virus en cerebro (cerca de 10^8 DL₅₀/ml) se encuentran en la etapa aguda (6 - 24 dpi). En la iniciación de la fase crónica comienzan a declinar los títulos virales, los que se van estabilizando con el transcurso del tiempo, oscilando alrededor de 10^5 DL₅₀/ml.

Se halló virus en el 50% de los animales crónicamente infectados. Este porcentaje es menor que el registrado en la fase aguda (76%), donde la activa replicación viral alcanza sus máximos niveles.

Nos interesaba conocer si la presencia del virus perturbaba los valores hematológicos, pues hay que considerar que sólo el 50% de los animales están infectados.

Para realizar las determinaciones hematológicas del *C.musculinus* persistentemente infectado, utilizamos los animales del grupo VI.

Agrupamos los datos obtenidos en los períodos 40 - 160 y 170 - 575 días de vida, según nuestros cálculos estadísticos.

En los cuadros 9 y 10 se presentan los valores hematológicos obtenidos. Observamos que no existen diferencias significativas entre valores provenientes de animales infectados y controles (Grupo VII).

Para buscar una respuesta más explícita sobre la acción de la infección en la hematología del *C.musculinus*, decidimos encarar un experimento, donde además de las valoraciones hematológicas en animales persistentemente infectados, también se llevará a cabo la búsqueda de virus en el cerebro de los mismos animales.

Los resultados hallados se encuentran en el cuadro NQ 11

CUADRO Nº 9

Valores hematológicos de *Calomys musculinus*
crónicamente infectados y controles. (Período 40-160 días de
edad)

	CONTROLES ⁽¹⁾		INFECTADOS ⁽²⁾		D
	Nº de Roedores	variable	Nº de Roedores	variable	
Volumen globular%	63	49,1 ^a 43-55 ^b	36	48,7 42-60	NS
Hemoglobina mmol/l	55	9,36 7,63-11,80	33	9,53 8,06-11,17	NS
Leucocitos x 10 ⁹ /l	60	6,30 2,50-13,50	32	7,00 3,70-12,80	NS
Neutrófilos%	64	15,60 8,00-33,00	36	14,50 8,00-35,50	NS
Linfocitos%	64	80,50 55,50-91,50	36	81,60 63,00-91,50	NS
Eosinófilos %	64	3,10 0-11,00	36	3,10 1,00-10,00	NS
Monocitos %	64	0,68 0-3,00	36	0,66 0-4,00	NS
Basófilos %	64	0	36	0	NS
Neutrófilos x 10 ⁹ /l	59	1,00 0,32-2,70	32	1,03 0,35-2,62	NS
Linfocitos x 10 ⁹ /l	59	5,17 1,56-11,20	32	5,67 2,33-10,56	NS
Monocitos x 10 ⁹ /l	59	0,035 0-0,177	32	0,050 0-0,280	NS

1 - Valores medios (X) obtenidos de *Calomys musculinus* sanos, de 40 - 160 días de vida.

2 - Valores medios (X) obtenidos de *Calomys musculinus* infectados, durante el período 38 - 158 dpi (40 - 160 días de vida).

a - Valores medios (X) obtenidos de cada variable.

b - Rango de la variable.

D - Diferencias entre animales infectados y no infectados.

NS - Diferencias no significativas.

CUADRO Nº 10
Valores hematológicos de *Calomys musculinus*
crónicamente infectados y controles. (Período 170 - 575 días de vida)

	CONTROLES ⁽¹⁾		INFECTADOS ⁽²⁾		D
	Nº de Roedores	variable	Nº de Roedores	variable	
Volumen globular%	31	46,3 ^a 41-50 ^b	48	46,6 42-55	NS
Hemoglobina mmol/l	30	9,16 8,06-10,23	32	9,30 7,44-10,86	NS
Leucocitos x10 ⁹ /l	24	4,90 1,50-8,80	42	5,10 2,00-11,10	NS
Neutrófilos%	31	19,66 8,50-35,00	45	20,18 3,50-33,50	NS
Linfocitos%	31	74,70 58,00-88,00	45	74,13 57,50-90,00	NS
Eosinófilos %	31	4,00 0,5-13,5	45	4,45 1,00-16,50	NS
Monocitos %	31	1,10 0-3,50	45	1,03 0-7,50	NS
Basófilos %	31	0	45	0	NS
Neutrófilos x 10 ⁹ /l	22	0,98 0,23-2,43	38	1,03 0,08-3,10	NS
Linfocitos x 10 ⁹ /l	22	3,83 0,95-7,05	38	3,83 1,50-6,80	NS
Monocitos x 10 ⁹ /l	22	0,054 0-0,289	38	0,047 0-0,56	NS

1 - Valores medios (X) obtenidos de *Calomys musculinus* sanos, de 170 - 575 días de vida.

2 - Valores medios (X) obtenidos de *Calomys musculinus* infectados, durante el período 172 - 572 dpi (174 - 575 días de vida).

a - Valores medios (X) obtenidos de cada variable.

b - Rango de la variable.

D - Diferencias entre animales infectados y no infectados.

NS - Diferencias no significativas.

CUADRO Nº 11
Título de virus en cerebro de *C. musculinus* crónicamente infectados y
valores hematológicos hallados en los mismos animales.

	<u>Calomys musculinus crónicamente infectados</u>													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
UFP/ml	3,5 x 10 ⁵	4,0 x 10 ²	<5	5,0 x 10 ⁴	<5	<5	2,3 x 10 ³	<5	6,0 x 10 ⁴	<5	7,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ³	<5	<5
Días de vida	100	122	126	129	133	133	140	140	141	188	200	200	220	246
Días post infección	97	116	123	126	130	130	138	138	139	186	196	196	217	243
Volumen globular %	46	52	46	48	46	47	49	46	42	50	48	46	43	45
Hemoglobina [mmol/l]	9,00	9,80	8,93	9,43	8,81	9,55	9,61	9,30	8,06	10,61	9,30	8,68	8,37	8,75
leucocitos x 10 ⁹ /l	9,30	4,80	4,30	5,60	4,40	7,10	7,20	6,50	7,70	10,30	4,40	8,90	4,60	4,00
Neutrófilos †	19	15	23	8	8	16,5	12	15	16,5	30	18	29	11	28
Linfocitos †	75,5	83	69,5	84,5	91,5	81	86	80	77	65,5	80	70	79,5	68,5
Eosinófilos †	3,5	2	5,5	7	0,5	2,5	0,5	4,5	4	4,5	2	0,5	5	2
Monocitos †	2	0	2	0,5	0	0	1,5	0,5	2,5	0	0	0,5	4,5	1,5
Basófilos †	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Comentario del Cuadro Nº 11 :

En primer lugar se observa que el 50% de los animales están infectados crónicamente y con títulos virales importantes mayores de 10⁴ UFP/ml y hasta 10⁵ UFP/ml, en total coincidencia con los datos de la figura Nº 5.

Si comparamos cada determinación hematológica proveniente de cada uno de los cricétidos con aislamiento viral positivo en el cerebro, con el valores medio normal (\bar{x}) correspondiente según la edad (Cuadros 9 y 10), comprobamos que son valores muy semejantes.

4.5. GLUCEMIA EN *C.musculus* INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.

4.5.1. Fase aguda.

Las determinaciones de las glucemias se realizaron en muestras de sangre provenientes de 47 cricétidos infectados y de 61 *C.musculus* sanos (grupos IV y V respectivamente).

Los animales mencionados fueron sangrados en el período comprendido entre los 13 y los 31 días de vida (corresponden a los 10 - 28 dpi en el grupo de animales infectados por haber sido inoculados a los 3 días de vida).

En el cuadro N^o 12 se presentan los valores de las glucemias de ambos lotes de animales, los días de vida de los mismos, así como los dpi.

Observamos que los animales controles sangrados a los 13-15-17-21-27-31 días de vida presentan valores medios que oscilan alrededor de 6 mmol/l. En el mismo cuadro se muestra que todos los grupos de animales infectados presenta valores medios de glucemias disminuidos respecto de los controles correspondientes.

El cálculo del valor medio para todo el conjunto de animales infectados es de $\bar{X} = 3,53$ mmol/l. En cambio para los animales sanos es de $\bar{X} = 6.15$ mmol/l con $p < 0,01$. Esto indica que los animales infectados presentaron hipoglucemia durante el período agudo de la enfermedad.

4.5.2. Fase crónica.

Se quiso verificar si se mantenía la hipoglucemia al avanzar la edad del cricétido inoculado o si se producía otra modificación en el metabolismo de la glucosa. Para ello realizamos la determinación de glucemia en muestras de sangre obtenidas de animales sanos e infectados de 45 a 63 días de edad (que corresponden a 43 - 61 dpi en los cricétidos infectados por haber sido inoculados a los 2 días de vida).

Para poder elaborar el cuadro N^o 13, trabajamos con un grupo

de 18 animales sanos y 20 cricétidos infectados (grupos VII y VI) respectivamente. En el mismo observamos que los valores medios (\bar{X}) hallados a los 45,50,58 y 63 días de vida son similares en ambos grupos. El valor medio para todo el lote de animales sanos es $\bar{X} = 6,77$ mmol/l y el del conjunto de cricétidos inoculados es de $\bar{X} = 6,72$ mmol/l, no existe diferencia significativa entre ambos valores.

Esta comprobación nos lleva a concluir que la hipoglucemia se establece en los animales que cursan la etapa aguda de la enfermedad y no se detecta en aquellos animales que la superan.

Valores promedios (\bar{X}) hallados en la determinación de glucemia en *C.musculus* sanos e infectados con Virus Junin, cepa XJCl₃.

Fase aguda.

CUADRO Nº 12

Días de vida de <i>Calomys musculus</i>	<i>C.musculus</i> Sanos ¹		<i>C.musculus</i> Infectados ¹		
	GLUCEMIAS (mmol/l)		GLUCEMIAS (mmol/l)		Días pi
	n	$\bar{x} \pm S$	n	$\bar{x} \pm S$	
13	8	6,44 ± 1,157	9	3,45 ± 1,420	10
15	12	6,28 ± 1,175	9	4,01 ± 1,300	13
17	10	5,50 ± 0,887	7	4,46 ± 2,000	14
21	10	5,94 ± 0,597	5	2,84 ± 0,138	18
27	13	6,58 ± 0,914	12	3,14 ± 1,750	23
31	8	6,04 ± 1,088	5	3,06 ± 0,677	28

1 - los *Calomys musculus* sanos e infectados fueron sometidos a un ayuno previo de 3 hs antes de la extracción de la muestra sanguínea.

Fase crónica

CUADRO Nº 13

Días de vida de <i>Calomys</i> <i>musculus</i>	<i>C. musculus</i> Sanos ¹		<i>C. musculus</i> Infectados ¹		
	GLUCEMIAS (mmol/l)		GLUCEMIAS (mmol/l)		Días pi
	n	$\bar{x} \pm S$	n	$\bar{x} \pm S$	
45	5	7,05 ± 0,494	6	7,00 ± 1,356	43
50	4	7,26 ± 1,966	4	6,64 ± 1,040	48
58	4	6,84 ± 0,870	5	6,72 ± 0,972	56
63	5	6,06 ± 1,095	5	6,43 ± 0,953	61

1 - Muestras obtenidas después de 3 hs de ayuno.

4.6. COMPARACION DE LOS VALORES DE UREMIA EN *C.musculus* INFECTADOS RESPECTO DE CONTROLES SANOS DEL MISMO RANGO DE EDAD.

Para el estudio de las uremias se utilizó un diseño experimental semejante al usado en las determinaciones de las glucemias.

Para hallar los valores del urea en sangre de animales que cursaban la fase aguda de la enfermedad y de sus controles correspondientes se utilizaron los grupos IV y V de *C.musculus*.

Se analizaron 34 muestras de sangre obtenidas de animales controles y 36 muestras sanguíneas provenientes de roedores que cursaban la etapa aguda de la enfermedad. Estas muestras fueron obtenidas en el período 13 - 31 días de vida (que corresponden a 10 - 28 dpi en animales infectados).

Comparando el valor medio hallado en el grupo de animales infectados $\bar{X} = 11,1$ mmol/l con el control correspondiente $\bar{X} = 11,3$ mmol/l, comprobamos que no existe diferencia significativa. Ambos valores son casi coincidentes.

Para el estudio de las posibles variaciones de la urea en sangre de animales crónicamente infectados, se realizaron 36 valoraciones en muestras de cricétidos crónicos y 35 determinaciones de uremia en animales controles (grupos VI y VII).

Las edades de los animales cuyas sangres se analizaron, estuvieron comprendidas entre 35 - 68 días de vida (que corresponden a 33 - 66 dpi en los animales inoculados). Nuevamente no existió diferencia significativa entre el grupo de animales infectados, cuyo valor medio es de $\bar{X} = 10.1$ mmol/l y el valor medio del lote de cricétidos sanos $\bar{X} = 11,2$ mmol/l.

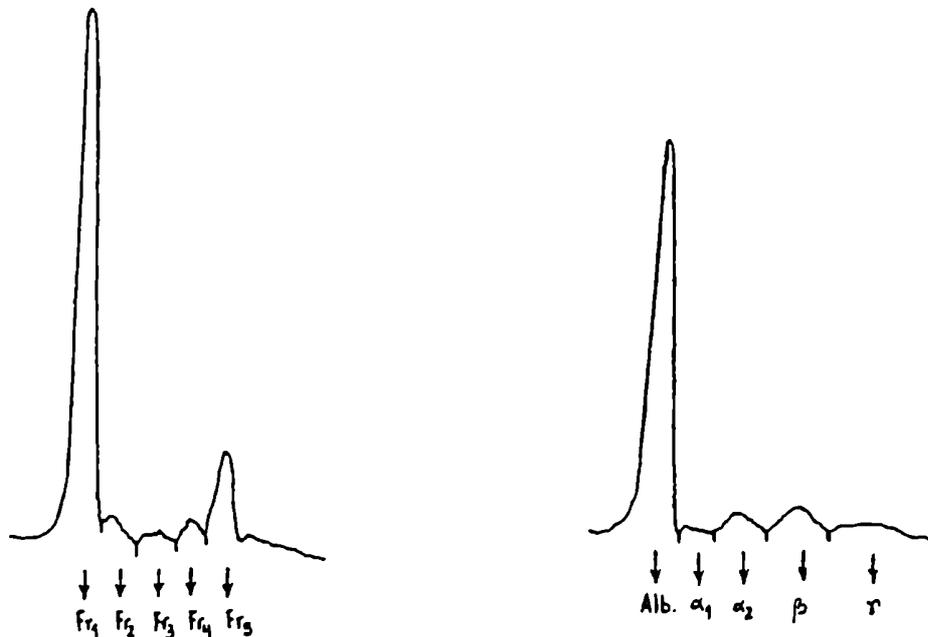
Por lo tanto concluimos que la concentración de urea en sangre de *C.musculus* no se modifica por causa de la infección con virus Junin.

4.7. PROTEINAS SERICAS.

4.7.1. Proteínas de *C.musculus* no infectado. Fraccionamiento en acetato de celulosa usando como sistema patrón un suero humano normal.

A pesar que en la bibliografía existen datos sobre el fraccionamiento proteico en acetato de celulosa de sueros de *C.musculus* no infectados (Hodara et al, 1987), usamos como patrón para poder identificar las bandas proteicas, un suero humano normal, por ser un sistema de referencia ampliamente estudiado.

FIGURA NO 7



Densitograma de un fraccionamiento sérico de *C.musculus* no infectado (control) 21 días de vida. Soporte: acetato de celulosa. Están indicadas las fracciones halladas.

Densitograma de un suero humano normal, proveniente de un electroforetograma realizado sobre acetato de celulosa.

Están indicadas las fracciones clásicas, Alb: albúmina y las globulinas α₁, α₂, β y γ.

En la fig. NQ 7 presentamos dos densitogramas, uno de los cuales proviene de un suero de *C.musculus* no inoculado, de aspecto semejante al hallado por Hodara et al. (1987) y el otro de un suero humano normal. Si observamos los mismos, concluimos que ambos sueros se resuelven en cinco fracciones proteicas, cuando se realizan los electroforetogramas correspondientes, sobre acetato de celulosa.

Hemos denominado Fr₁, Fr₂, Fr₃, Fr₄ y Fr₅ a las fracciones séricas que se obtienen cuando se realiza la electroforesis del suero del *C.musculus*, en acetato de celulosa. No adoptamos la nomenclatura clásica del suero humano normal (albúmina y globulinas α₁, α₂, β y γ) porque no conocemos la composición proteica de cada fracción que se obtiene en el suero del *C.musculus*.

Haciendo una analogía, la Fr₁ se corresponde con la albúmina en el electroforetograma en acetato de celulosa del suero humano normal, la Fr₂ con la α₁ globulina y así sucesivamente.

Si comparamos los densitogramas presentados, vemos que existen diferencias notorias en la forma de ambos. La Fr₅ del suero del *C.musculus* se presenta como una banda bien definida y no muy ancha, a diferencia de su análoga, la fracción γ globulina humana que es una banda ancha y difusa.

Las probables causas de las distintas formas que presentan los densitogramas, se deberían a diferencias en la composición y distribución de las proteínas séricas.

4.7.2. Titulación de virus en cerebros de *Calomys musculus* infectados experimentalmente. Fase aguda.

Para comprobar la instalación de la infección en los *C.musculus* infectados perinatalmente, se realizó la titulación de virus en los cerebros de los animales sacrificados (cuadro NQ 14). Los sueros provenientes de estos animales fueron procesados mediante el fraccionamiento sobre acetato de celulosa y los resultados hallados se muestran en el cuadro NQ 15.

CUADRO Nº 14

CEREBRO	DIAS DE VIDA	DIAS POST INFECCION	TITULO UFP/ml
440 ₁	17	15	<5
438 ₂	17	15	<5
441	17	15	<5
443 ₅	17	15	<5
450 ₁	22	20	<5
450 ₂	22	20	6,3 x 10 ⁵
447 ₁	23	20	1,5 x 10 ³
447	23	20	2,5 x 10 ³
447 ₂	25	22	1,5 x 10 ³
447 ₃	25	22	<5
448 ₁	25	22	5,15 x 10 ⁶
448 ₂	25	22	<5
447 ₄	25	22	7,0 x 10 ³
445	25	22	<5
443	25	22	<5
444	25	22	<5

Como se observa en los resultados presentados en el cuadro Nº 14, obtuvimos título de virus en algunos animales, lo que indica que se estableció la infección experimental.

4.7.3. Fraccionamiento de sueros provenientes de *C.musculus* inoculados con virus Junin, cepa XJCl₁ en acetato de celulosa gelificado. Fase aguda de la enfermedad.

Animales inoculados a los 2 - 4 días de vida con 4000 DL₅₀ de virus Junin, Cepa XJCl₁, se sangraron a distintos dpi durante el período 15 - 22 dpi (17 - 25 días de vida) para obtener los sueros correspondientes. El ayuno previo fue de 3 horas (grupo VIII). Luego de extraídas las muestras sanguíneas, los roedores fueron sacrificados para realizar la búsqueda de virus en

cerebro (cuadro N^o 14).

Se obtuvieron sueros controles provenientes de animales no inoculados 17 - 30 días de vida, por sangrado en idénticas condiciones (grupo IX).

Se procedió a determinar las proteínas totales en el suero de animales no inoculados e infectados perinatalmente, utilizando la técnica de Lowry et al. (1951). Los mismos sueros fueron sometidos a un fraccionamiento proteico realizado sobre acetato de celulosa gelificado. Cada fraccionamiento proteico fue cuantificado por densitometría. En el cuadro N^o 15 se presentan los resultados hallados.

CUADRO N^o 15

ESPECIE	PERIODO DE VIDA	n	Prot tot ¹ [g/l]	Pr ₁ ² %	Pr ₂ ² %	Pr ₃ ² %	Pr ₄ ² %	Pr ₅ ² %
<i>C. muscu- linus</i> inoculados IXCl ₃	17-25 días. de vida correspon- den a 15-22 dpi	22	64,8 ^a	69,1	5,1	3,1	5,8	16,7
			±	±	±	±	±	
<i>C. muscu- linus</i> sanos	17-30 días de vida	23	9,04	2,56	1,11	2,18	1,66	2,32
			±	±	±	±	±	
			66,0	69,8	5,2	3,6	5,7	15,6
			±	±	±	±	±	±
			5,40	8,06	1,19	2,42	1,64	5,80
			NS	NS	NS	NS	NS	NS

(1) Prot. tot. [g/l]: concentración de proteínas totales [g/l]

(2) Cuantificación porcentual de las fracciones séricas (Pr₁, Pr₂, Pr₃, Pr₄, Pr₅) que se obtienen cuando se realiza la electroforesis del suero del *Calomys musculinus*, en acetato de celulosa.

(a) valores medios ± desviación estándar (X±S).

NS: Diferencias no significativas.

Como observamos en el cuadro NQ 14, no se hallan diferencias significativas entre las concentraciones de proteínas totales provenientes de animales sanos e inoculados.

Al comparar las distintas fracciones proteicas obtenidas de sueros de *Calomys musculinus*, comprobamos que no difieren significativamente.

Por lo tanto concluimos que la infección aguda establecida en el grupo de *Calomys musculinus* inoculados, no modifica el perfil proteico tanto en su forma cualitativa como en la cuantitativa.

4.7.4. Titulación de virus en los cerebros de *Calomys musculinus*, inoculados con virus Junin, cepa XJCl₃, cuyos sueros fueron fraccionados en gel de poliacrilamida.

Se buscó la presencia de virus en los cerebros de animales inoculados con virus Junin, cepa XJCl₃ que cursaban las etapas aguda y crónica de la enfermedad y cuyos sueros fueron analizados en las placas de gel de poliacrilamida.

Se utilizó la técnica de unidades formadoras de placa bajo agar (Damonte y Coto, 1974).

CUADRO Nº 16

CEREBRO	DIAS DE VIDA	DIAS POST INFECCION	TITULO UFP/ml
495 ₂	21	19	2,0 x 10 ⁴
495 ₁	21	19	3,5 x 10 ⁵
496 ₁	21	19	<5
495	21	19	<5
496 ₂	24	21	5,0 x 10 ³
496 ₃	24	21	2,3 x 10 ³
493	93	90	<5
496 ₇	93	90	<5
496 ₆	93	90	2,3 x 10 ³
496 ₅	93	90	6,0 x 10 ²
496 ₄	93	90	7,0 x 10 ³

Los resultados indican que la infección se estableció en los animales inoculados experimentalmente.

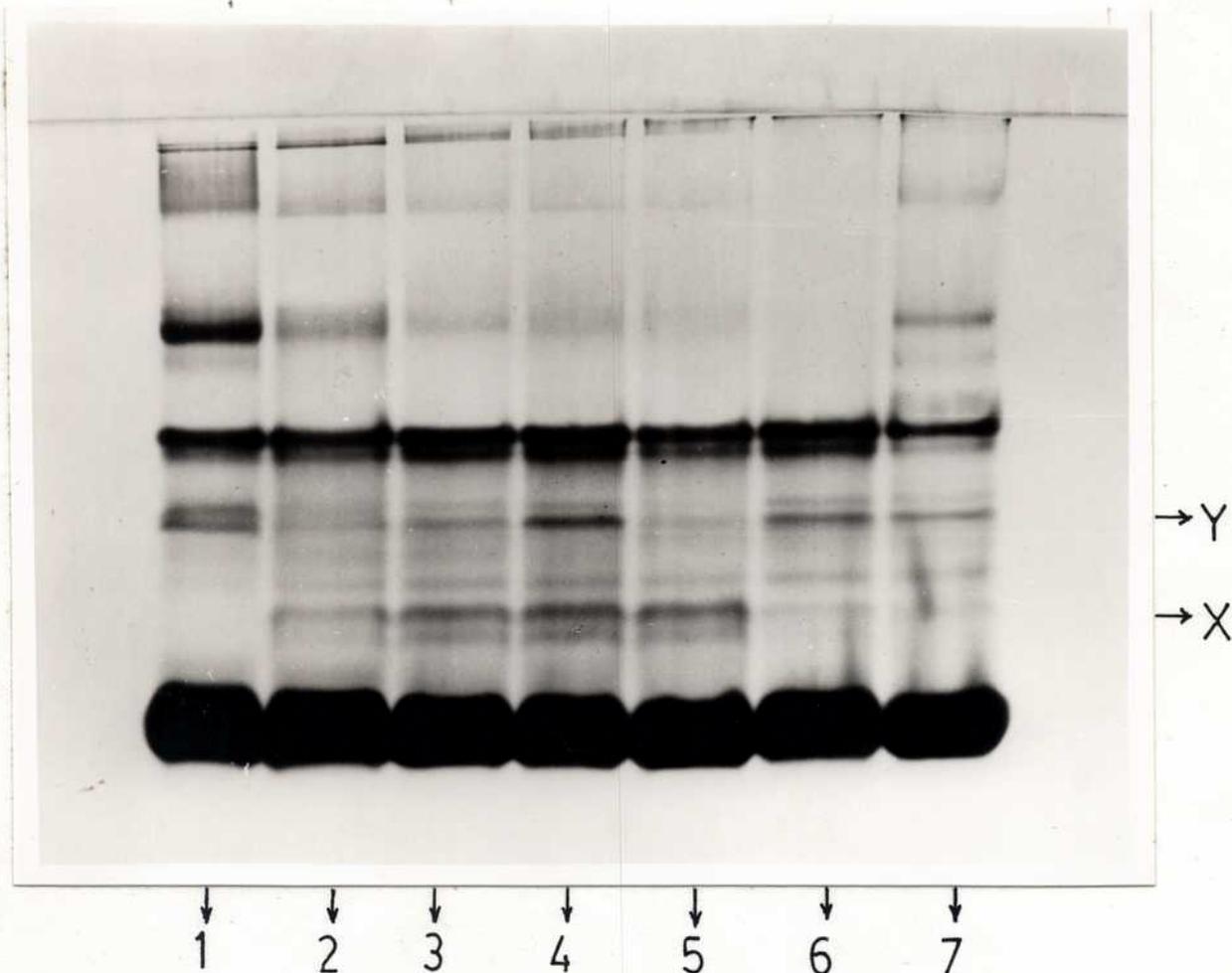
4.7.5. Separación electroforética en placa de gel de poliacrilamida de proteínas séricas de *Calomys musculinus*, inoculados con 4000 DL₅₀/ml, de virus Junin, cepa XJCl₃ y controles.

4.7.5.a. Fase aguda de la enfermedad.

Con el objeto de obtener mayor resolución en el fraccionamiento proteico de los sueros de los cricétidos, utilizamos la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, el cual actúa como un notable tamiz molecular, fraccionando las proteínas de acuerdo a su tamaño molecular, además de su carga eléctrica.

Hemos realizado varias separaciones electroforéticas en placa de gel de poliacrilamida de sueros obtenidos de animales que cursaban la fase aguda de la enfermedad. La fotografía N^o 1 es una muestra de una de ellas. Los resultados que presentamos fueron hallados en todos los fraccionamientos proteicos realizados en condiciones similares.

FOTOGRAFIA N^o 1



Como hemos referido anteriormente se presenta en la fotografía N^o 1 una placa de gel de poliacrilamida. En la misma se muestra la separación electroforética de cinco sueros (2, 3, 4, 5, 6) de *Calomys musculinus* infectados (etapa aguda, grupo X) y de sus controles 1 y 7 (grupo XI).

En cada calle se sembraron 4 μ l. de suero
El orden de siembra es el que se indica en el esquema N^o 1.
De izquierda a derecha es:

ESQUEMA Nº 1

Nº DE ORDEN	1	2	3	4	5	6	7
DIAS POST INFECCION		19	19	19	21	21	
DIAS DE EDAD	26	21	21	21	24	24	26(23CRBN)
	CONTROL II						CONTROL I
PROTEINAS TOTALES [g/l]	71	76	64	63	63	70	68
Nº DE <i>C. musculus</i>	488 ₂	495 ₂	495 ₁	496 ₁	496 ₂	496 ₂	486 ₃
TITULO DE VIRUS EN CEREBRO UPP/ml		2,0x10 ⁴	3,5x10 ⁵	<5	5,0x10 ³	2,3x10 ³	

Los sueros Nº 1 y 7 son controles. El suero Nº 1 (control II) provino de un animal sano de 26 días de vida. El suero Nº 7 (control I) se obtuvo de un animal sano inoculado a los 3 días de vida con 0,02 ml de una solución al 10% p/v, de un homogeneizado de cerebro de ratón blanco normal (CRBN), procesado en las mismas condiciones que se utilizan en la preparación del stock viral. Los demás sueros (Nº 2, 3, 4, 5, 6) fueron obtenidos de cricétidos inoculados entre los 2 - 4 días de vida con 0.02 ml de 4000 DL₅₀/ml de virus Junin, cepa XJCl₃

Estos animales fueron sangrados en los días indicados en el esquema Nº 1.

El objeto de sembrar el control I, fue para verificar si la introducción intraperitoneal de pequeñas cantidades de proteínas que acompañan al inóculo de virus, pueden actuar antigénicamente en el *Calomys musculus*. No se comprobó variaciones entre las bandas proteicas de los controles I y II.

El control II que se presenta en la fotografía Nº 1, no tuvo una resolución nítida en la zona inferior de la separación electroforética, donde las bandas proteicas se visualizan en forma tenue.

Si analizamos los sueros provenientes de animales infectados, se observa la intensificación de una banda proteica que hemos llamado X en los sueros N^o 2, 3, 4, y 5 de animales agudos. Así mismo disminuye la intensidad de coloración de la banda que llamamos Y (sueros 2, 3 y 5).

En algunos casos la fracción proteica Y se torna casi imperceptible como sucede con el suero N^o 5.

Como podemos apreciar, las variaciones de intensidad de las bandas proteicas X e Y no se presentan en la totalidad de los sueros analizados, obtenidos durante la fase aguda de la enfermedad.

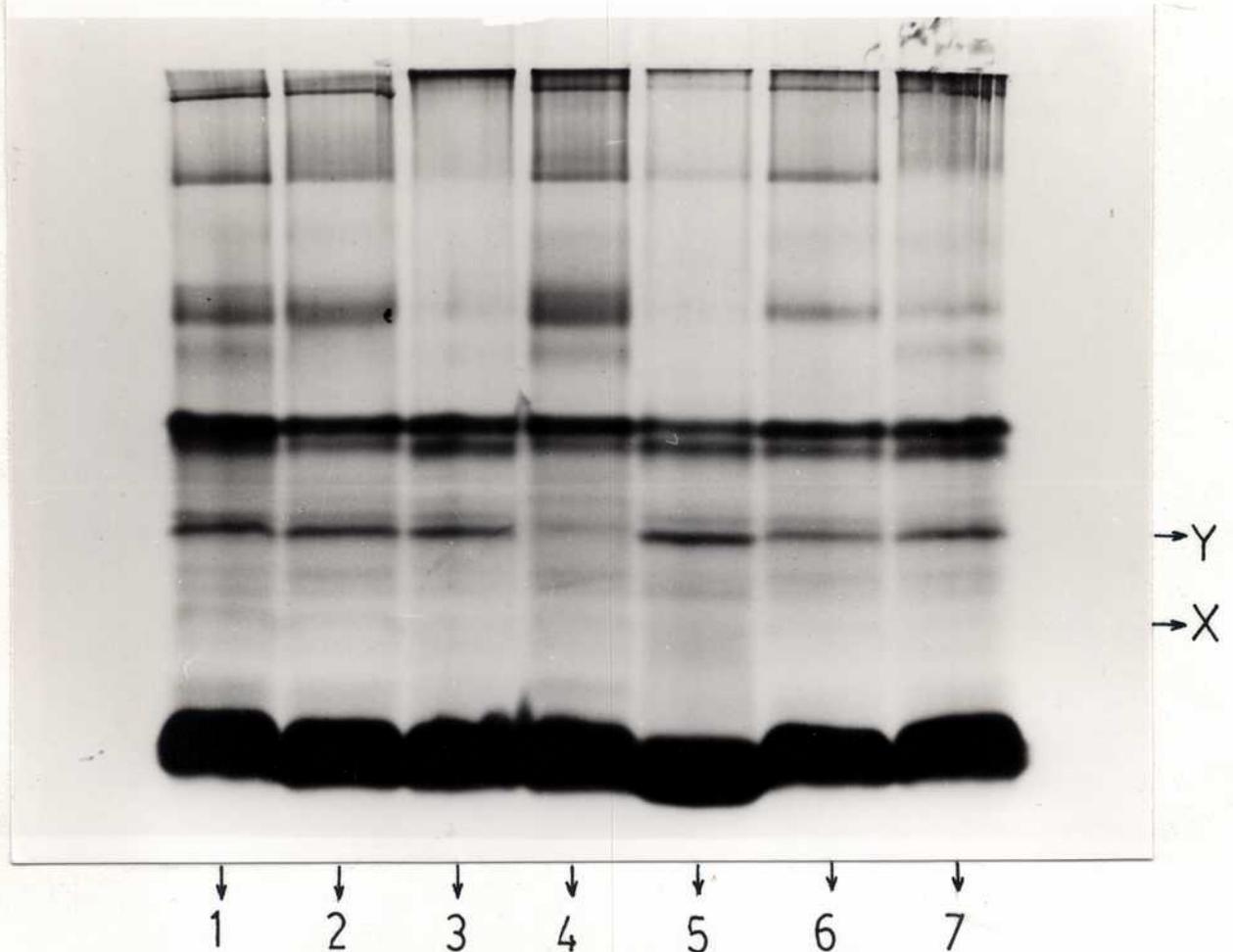
Las modificaciones de la intensidad en la coloración de las bandas proteicas X e Y no se observaron en fraccionamientos proteicos realizados en condiciones similares, con sueros obtenidos de *Calomys musculinus* normales.

Como se mencionó anteriormente, solamente se describen las modificaciones que se registraron repetidamente en otras separaciones electroforéticas realizadas en placa de gel de poliacrilamida.

4.7.5.b. Fase crónica de la enfermedad.

Esta parte de nuestra investigación la encaramos con un diseño experimental análogo al descrito en la sección anterior.

FOTOGRAFIA Nº 2



Presentamos en la fotografía Nº 2 un fraccionamiento electroforético de sueros de *Calomys musculus* crónicamente infectados (grupo X) (Nº 2, 3, 4, 5 y 6) y sueros controles (grupo XI) (Nº 1 y 7).

La separación electroforética ha sido realizada en placa de gel de poliacrilamida, sembrándose 4 µl. de cada muestra de suero en las calles de la misma.

El orden en que se realizó la siembra fue el indicado en el esquema N° 2, siendo de izquierda a derecha, el siguiente:

ESQUEMA N° 2

Nº DE ORDEN	1	2	3	4	5	6	7
DIAS POST INFECCION		90	90	90	90	90	
DIAS DE EDAD	100	93	93	93	93	93	100(98CRBN)
	CONTROL II						CONTROL I
PROTEINAS TOTALES (g/l)	75	70	63	72	65	63	68
Nº DE <i>C. musculus</i>	488	493	496 ₇	496 ₆	496 ₅	496 ₄	489
TITULO DE VIRUS EN CEREbro UFP/ml		<5	<5	2,3x10 ³	6,0x10 ²	7,0x10 ³	

Los controles I (CRBN) y II fueron sembrados en las posiciones 7 y 1 respectivamente. Por observación directa vemos que no presentan diferencias apreciables entre la intensidad de colocación de sus bandas proteicas.

Estos resultados son coincidentes con los hallados en otros fraccionamientos realizados en gel de poliacrilamida.

Si tratamos de visualizar la banda proteica que llamamos X en los sueros N° 2, 3, 4, 5 y 6, vemos que ésta se tinte tenuemente y de manera semejante a los controles I y II. Por lo tanto la intensificación de ésta banda que se observaba en algunos sueros provenientes de animales infectados que cursaban la etapa aguda, no se detecta en la fase crónica de la enfermedad.

Observamos que la fracción proteica Y tiende a normalizarse en sueros extraídos de animales infectados crónicamente. Lo descrito anteriormente se observa en los sueros NQ 2, 3, 5 y 6, no así en el suero NQ 4.

Hemos apreciado en diferentes separaciones electroforéticas, realizadas en idénticas condiciones, que en general no existen diferencias entre el fraccionamiento proteico de los controles normales y las muestras de animales crónicamente infectados.

4.7.5.c. Separación electroforética en placa de gel de poliacrilamida de sueros de *C. musculus* inoculados con virus Junin, cepa XJCl₃.
Fases aguda y crónica de la enfermedad y sueros controles.
Comparación con sueros humanos normales.

FOTOGRAFIA Nº 3



La fotografía N^o 3 corresponde a una separación electroforética en placa de gel de poliacrilamida. En la misma se sembraron sueros de *Calomys musculinus* sin inocular y de cricétidos infectados (fase aguda y crónica de la enfermedad) y sueros humanos normales.

El orden de siembra es el siguiente, de izquierda a derecha.

ESQUEMA N^o 3

	Suero de <i>C. MUSC</i> (Crónico)	Suero de <i>C. MUSC</i> (Agudo)	Suero de humanos	Suero de <i>C. MUSC.</i> (Crónico)	Suero de <i>C. MUSC.</i> (Normales)	Suero de humanos normales
N ^o DE ORDEN	1	2	3	4	5	6
DIAS POST INFECCION	90	19		90		
DIAS DE EDAD	93	21	mezcla de 3 sueros de humanos adultos normales	93	mezcla de 3 sueros de <i>C. MUSC.</i> de 30-35-45 días de vida	
PROTEINAS TOTALES [g/l]	68	66	77	65	70	77
N ^o DE <i>C. musculinus</i>	496 ₆	495		496 ₇		
TITULO DE VIRUS EN CEREBRO UPP/ml	2,3x10 ³	<5		<5		

Usamos una mezcla de 3 sueros normales, tanto para el patrón humano (Nº 3 y 6) como para el del *Calomys musculinus* (Nº 5), para independizarnos de las variaciones individuales.

Como vamos a utilizar el suero humano normal como sistema de referencia, hemos identificado en el fraccionamiento del mismo algunas bandas proteicas (Castagnino, 1968; Allen, 1978).

Comparando las separaciones electroforéticas obtenidas, comprobamos que las fracciones proteicas del suero humano normal (Nº 3 y 6), presentan una ligera disminución en la movilidad electroforética, con respecto a las bandas halladas en los sueros *Calomys musculinus*. Lo que hemos descrito se observa claramente en las posiciones ocupadas por la transferrina, la ceruloplasmina y la albúmina humana que tienen supuestas bandas análogas en la separación proteica del *Calomys musculinus*.

La fracción proteica que llamamos Y en el suero de cricétido, es una banda que se destaca por su intensidad de coloración y su grosor. No hallamos banda supuestamente homóloga en el suero humano normal.

Si observamos la resolución de los sueros de animales infectados crónicamente sembrados en las calles 1 y 4 y los comparamos con el patrón normal (calle 5), hallamos que el suero sembrado en posición 1 presenta una disminución en la intensidad de coloración de la banda Y. No sucede así con el suero de cricétido crónico de la calle 4. Este último suero no se resolvió en la parte superior de la separación electroforética, fenómeno que se observó cuando los sueros son almacenados a -20 °C previamente a su fraccionamiento electroforético.

El suero proveniente de un animal en la fase aguda de la enfermedad, está sembrado en la calle Nº 2 y presenta en forma clara la intensificación en la coloración de la banda X, que ha sido descrita con anterioridad para sueros provenientes de la fase aguda. El suero sembrado en la calle Nº 2, proviene de un cricétido que no presenta virus en cerebro.

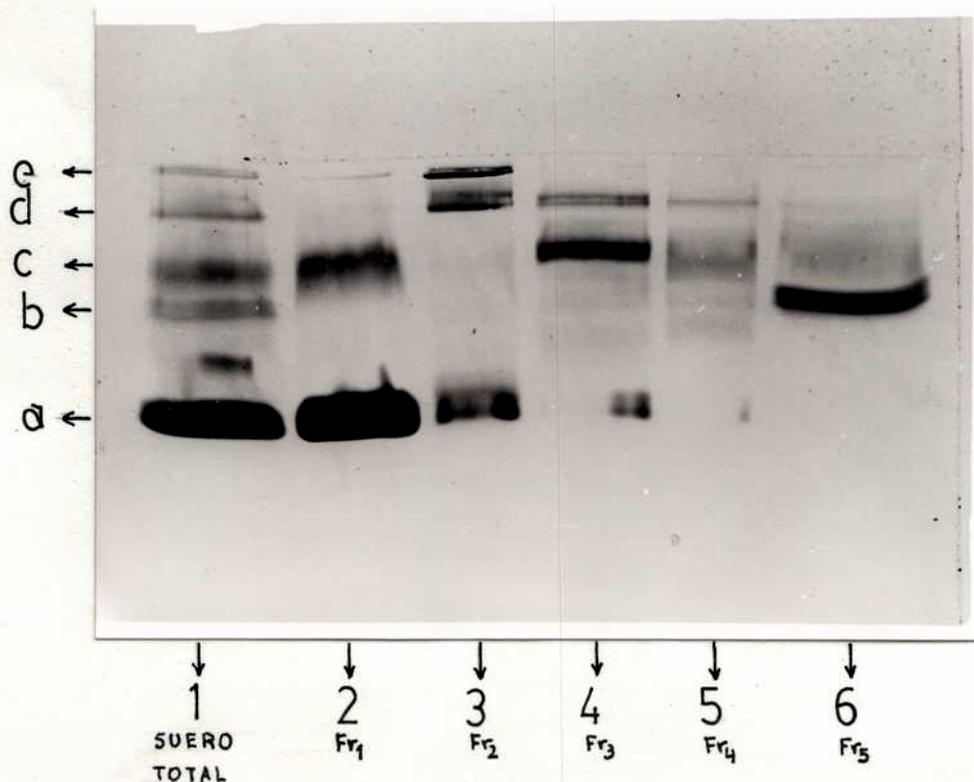
4.7.5.d. Fraccionamiento sérico en dos pasos sucesivos: a) acetato de celulosa b) gel de poliacrilamida. Aplicación a sueros provenientes de *C.musculinus* no inoculados y de seres humanos normales. Comparación de los resultados hallados.

Anteriormente hemos presentado los resultados hallados en el fraccionamiento sérico del *C.musculinus*, en acetato de celulosa y gel de poliacrilamida.

Con el objeto de aportar nuevos conocimientos en el procesamiento proteico del suero del cricétido, resolvimos combinar las dos (2) técnicas antes mencionadas como se detalla en Materiales y Métodos. Así a cada banda proteica obtenida en acetato de celulosa, la sometimos a un nuevo fraccionamiento en gel de poliacrilamida.

Presentamos los resultados de aplicar esta técnica en dos (2) pasos sucesivos a la mezcla de sueros de *C.musculinus* no inoculados , en la fotografía Nº 4.

FOTOGRAFIA Nº 4



El orden de siembra es el siguiente :

1 - Muestra de suero total de *C.musculinus* normal (mezcla de 3 sueros provenientes de cricétidos sanos de 30, 35 y 45 días de vida). No ha sido fraccionado previamente en acetato de celulosa. Proteínas totales: 70 g/l.

- 2 - Fr₁ : Fracción 1 ————
- 3 - Fr₂ 2 Fracciones obtenidas en acetato de
- 4 - Fr₃ : 3 celulosa y sembradas en gel de
- 5 - Fr₄ : 4 poliacrilamida.
- 6 - Fr₅ : 5 ————

Designamos con las letras a, b, c, d y e a las principales bandas o grupos de bandas que se aprecian por observación directa, en la separación proteica del suero total del *C.musculinus*.

La Fr₁, sembrada en la calle N^o 2, contiene la banda que hemos denominado a en el suero total del *C.musculinus*. Pensamos que esta banda a es la albúmina del cricétido.

Observamos que cerca de la siembra de la Fr₁, se presentan vestigios de la banda e, cuya visualización es nítida en la Fr₇.

Siguiendo con el análisis de la calle N^o 2, vemos la presencia de una banda difusa a la altura de la fracción c del suero total.

Esta fracción proteica no apareció en otras separaciones electroforéticas y quizás su presencia se deba a un efecto de "arrastre proteico" por cantidad excesiva de muestra sembrada. Recordemos que necesitamos que la concentración proteica sea suficiente en la tira de acetato de celulosa para que sea visualizada en una segunda separación electroforética, en gel de poliacrilamida.

La Fr₂, sembrada en la posición N^o 3, contiene la mayor parte de las bandas que hemos llamado e y d en el suero total. En la parte inferior de la calle N^o 3 se visualizan vestigios de la banda a.

En la separación electroforética de la Fr₃ se encuentra casi exclusivamente la banda c (suero total). También se visualizaron componentes de la banda d.

En el fraccionamiento proteico de la Fr₄ aparecen bandas tenues y difusas, algunas nombradas anteriormente como las bandas d y c.

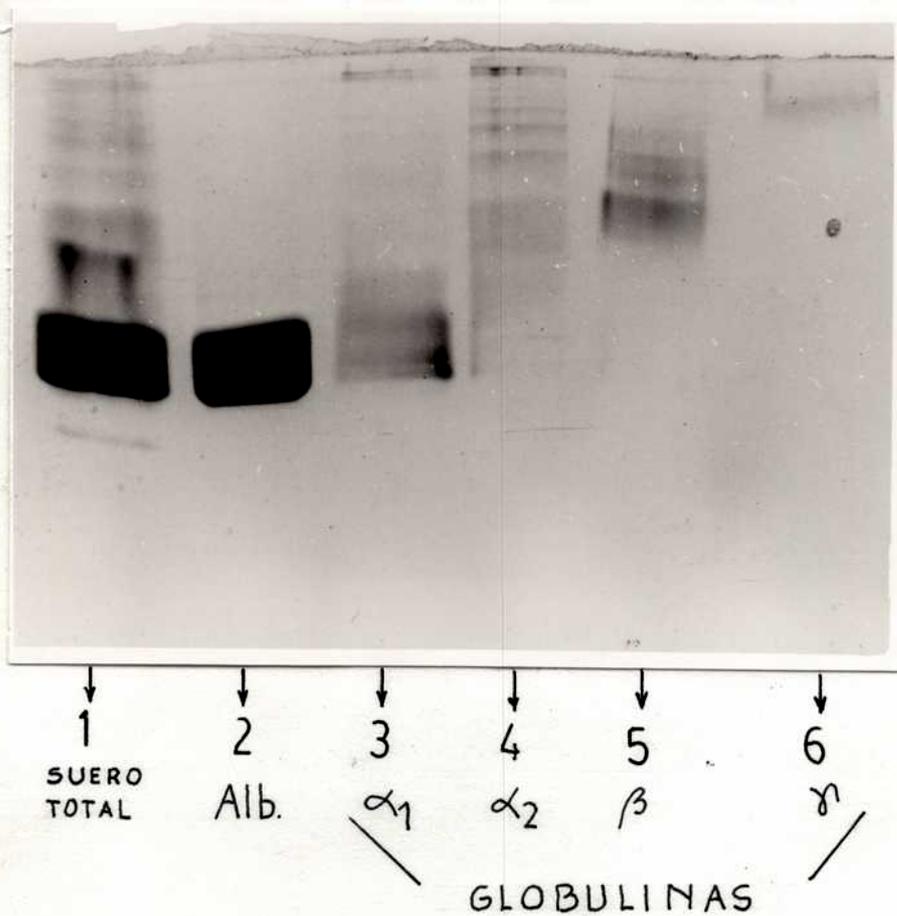
La Fr₅ fue sembrada en posición N^o 6. En ella observamos la presencia de la banda que llamamos b. Esta fracción proteica es visualizada en forma nítida y definida. En la misma calle (N^o 6) se hallan otras bandas teñidas en forma tenue.

En forma general podemos decir que las fracciones Fr₂, Fr₃ y Fr₄ presentan la banda d. En cambio las Fr₁ y Fr₂ contienen la banda e.

Por otro lado la banda b se encuentra solamente en la Fr₅.

O sea que cuando sometemos el suero del *C. musculinus* a un fraccionamiento electroforético en acetato de celulosa, existen proteínas que se distribuyen en distintas bandas proteicas, mientras que otras migran hacia una determinada fracción. Este comportamiento es similar al descrito para el suero humano (Laurell, 1973) y lo comprobamos con los resultados presentados en la fotografía N^o 5.

FOTOGRAFIA Nº 5



Hemos sometido una muestra de suero humano normal a fraccionamiento proteico, aplicando la técnica en dos pasos sucesivos. Los resultados hallados se muestran en la fotografía Nº 5, donde:

- 1 - Muestra de suero total, proveniente de seres humanos normales (mezcla de 3 sueros humanos normales) Proteínas totales 77 g/l.
- 2 - Alb: Albúmina.
- 3 - α_1 — } Fracciones obtenidas mediante
- 4 - α_2 } previo fraccionamiento en acetato
- 5 - β } de celulosa y sembradas en gel
- 6 - γ — } de poliacrilamida.

En la calle N^o 1 sembramos el suero humano total y en las posiciones 2,3,4,5 y 6 las fracciones Alb, α_1 , α_2 , β y γ globulinas.

La muestra de suero humano normal (1) se resuelve en numerosas bandas proteicas. Se divisa con claridad la prealbúmina.

La albúmina fue sembrada en la posición N^o 2, observamos una banda proteica única, sin otras proteínas acompañantes.

Si analizamos la separación electroforética en gel de poliacrilamida de las fracciones α_1 (3), α_2 (4), β (5) globulinas, comprobamos que las respectivas calles presentan bandas proteicas que difieren en intensidad de color, pero que son muy semejantes entre sí. Suponemos que provienen de una misma proteína distribuida en 2 ó más fracciones proteicas (α_1 , α_2 , β) obtenidas en acetato de celulosa.

La fracción γ globulina se resuelve en el gel de poliacrilamida, como una banda difusa y ubicada en las cercanías del lugar de siembra.

Si comparamos los resultados hallados en el suero del *C. musculus* sano, con los encontrados en el suero humano normal, comprobamos que la diferencia más notable entre ambos fraccionamientos, reside precisamente en la Fr₃ proveniente del

roedor y su análoga la fracción γ globulina del suero humano normal.

En el primer caso se visualiza una fracción proteica dominante que se resuelve en el gel de poliacrilamida en forma nítida y bien definida, situada a cierta distancia del lugar de siembra.

En el segundo caso se observa una banda difusa y ancha, ubicada en las cercanías de la siembra. (Fotografías N^o 4 y 5 respectivamente).

Este análisis concuerda con lo descrito anteriormente en los densitogramas de los respectivos fraccionamientos en acetato de celulosa.

4.7.6. Titulación de virus en cerebros de animales sobrevivientes a la inoculación con virus Junin, cepa XJCl₁, cuyos sueros fueron analizados por inmunoelectroforesis.

Para la titulación del virus se utilizó el método de unidades formadoras de placa bajo agar (Damonte y Coto, 1974).

CUADRO Nº 19

CEREBROS	DIAS DE VIDA	DIAS POST INF.	TITULO UFP/ml
463 ₁	21	19	3,45 x 10 ⁴
463 ₂	21	19	3,55 x 10 ⁵
465 ₂	21	19	< 5
465 ₁	21	19	< 5
464 ₁	21	19	< 5
464 ₂	21	19	< 5
465 ₅	23	21	< 5
465 ₄	23	21	4,0 x 10 ³
465 ₆	23	21	4,5 x 10 ⁴
465 ₇	23	21	< 5
462 ₂	23	21	< 5
479 ₂	49	47	< 5
479 ₁	49	47	5,0 x 10 ³
477	49	47	2,3 x 10 ³
478	49	47	5,7 x 10 ⁵
479 ₃	71	69	< 5
480 ₁	71	69	7,0 x 10 ²
481 ₃	73	71	1,0 x 10 ⁴
481 ₁	73	71	6,0 x 10 ³
481 ₂	73	71	< 5
483 ₃	79	76	< 5
483 ₂	79	76	< 5

4.7.7. Inmunolectroforesis de sueros de *C.musculus* no inoculados e infectados.

Para el desarrollo de esta parte de nuestra experimentación utilizamos los grupos XII y XIII de animales.

Procesamos los siguientes sueros :

1) Sueros de *C.musculus* infectados (fases aguda y crónica de la enfermedad) que fueron inoculados a los 2 - 4 días de vida, por vía ip, con 4000 DL₅₀/ml de virus Junin, cepa XJCl₃.

2) Sueros de *C.musculus* que fueron inoculados a los 2 - 4 días de edad, por vía ip con 0,02 ml de una suspensión al 10% p/v de cerebro de ratón blanco lactante normal (CRBN) (sueros controles I).

3) Sueros de *C.musculus* obtenidos de animales sanos en distintos días de vida (sueros controles II).

A continuación presentamos un esquema de la seroteca utilizada:

CUADRO Nº 17

SUEROS DE ANIMALES INOCULADOS CON VIRUS JUNIV, Cepa XJCl ₃ .				SUEROS CONTROLES I (CRBN)			SUEROS CONTROLES II	
F A S E	días pi	días de edad	cantidad de sueros	días post inocula- ción	días de edad	Cantidad de sueros	días de edad	cantidad de sueros
A G U D A	10	12	5	13	15	6	17	3
	16	18	7	17	20	4	18	3
	19	21	7	23	25	1	21	3
	21	23	11				25	4
C R O N I C A	31	34	4	32	34	4	73	3
	38	40	1	44	46	5	78	5
	47	49	4					
	69	71	3					
	71	73	4					
	76	78	3					

a) Dosaje de proteínas totales séricas.

Se procedió a determinar las proteínas totales de cada uno de los sueros obtenidos de animales infectados perinatalmente y de los sueros controles I y II, utilizando el método de Lowry, et al. (1951).

Los animales fueron sometidos a un ayuno previo de 3 hs, antes de la extracción de la muestra.

A continuación presentamos los valores medios (\bar{X}) de las determinaciones de proteínas totales. Agrupamos los sueros extraídos de los animales infectados en agudos y crónicos, teniendo en cuenta la edad del animal en el momento de la extracción de la muestra.

Los datos de los controles I y II fueron agrupados en la misma forma cronológica.

CUADRO NO 18

Animales inoculados	Controles I	Controles II
<u>Datos correspondientes al estado agudo</u> 10-21 dpi corresponden a 12-23 días de vida $\bar{X} = 68,0 \text{ g/l}$ $n = 30$ $s = 9,88$	13-23 días post inoculación CRBN corresponden a 15-25 días de vida $\bar{X} = 65,8 \text{ g/l}$ $n = 11$ $s = 6,92$	17-25 días de vida $\bar{X} = 64,3 \text{ g/l}$ $n = 13$ $s = 6,58$
<u>Datos correspondientes al estado crónico</u> 31-76 dpi corresponden a 34-78 días de vida $\bar{X} = 65,7 \text{ g/l}$ $n = 19$ $s = 9,43$	32-44 días post inoculación CRBN corresponden a 34-46 días de vida $\bar{X} = 68,1 \text{ g/l}$ $n = 9$ $s = 15,62$	73-78 días de vida $\bar{X} = 65,0 \text{ g/l}$ $n = 8$ $s = 8,03$

Los valores medios (\bar{X}) del dosaje de proteínas totales de animales inoculados y de sus controles no difieren significativamente.

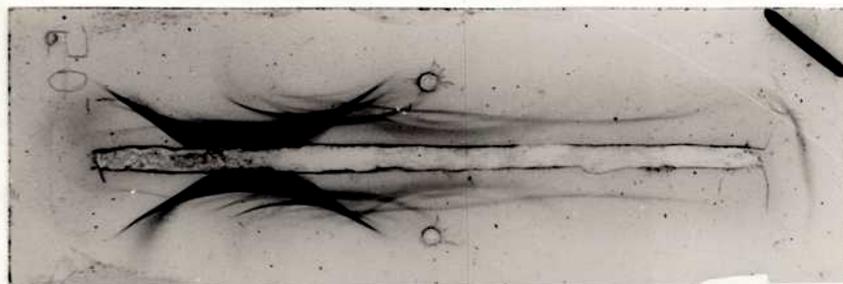
b) Separación inmunolectroforética.

Todos los sueros que constituían la seroteca fueron analizados inmunolectroforéticamente, junto con los controles I y II.

Cada suero proveniente de un cricétido infectado fue analizado dos (2) veces, utilizándose suero de conejo, antisuero total de *C.musculus* en una de ellas y en otra suero de conejo, antisuero parcial de *C.musculus*, para realizar la inmunoprecipitación.

A continuación presentamos las fotografías de los inmunolectroforetogramas que hemos denominado A, B y C (fotografías 6, 7 y 8 respectivamente).

INMUNOELECTROFORETOGRAMA A
FOTOGRAFIA Nº 6

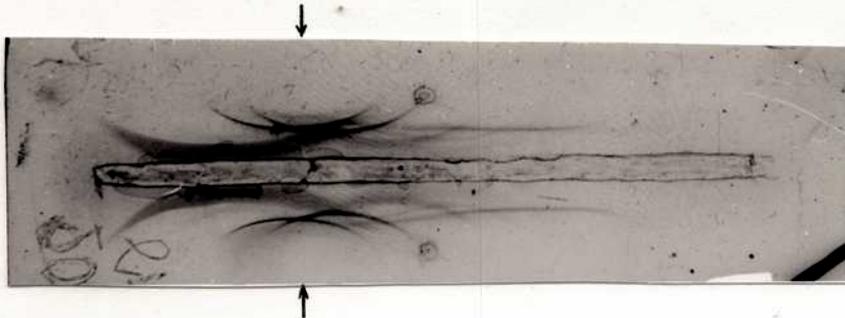


A: antígeno : la línea negra en la esquina del portaobjeto indica que se ha sembrado de ese lado suero proveniente de cricétido infectado, en este caso 5 μ l de suero de *C.musculus* de 76 días pi (fase crónica).

En el otro orificio se sembraron 5 μ l de suero de *C.musculus* normal de 78 días de vida (suero control II).

antisuero : 80 μ l de antisuero total de *C.musculus*, obtenido en conejo.

INMUNOELECTROFORETOGRAMA B
FOTOGRAFIA N^o 7

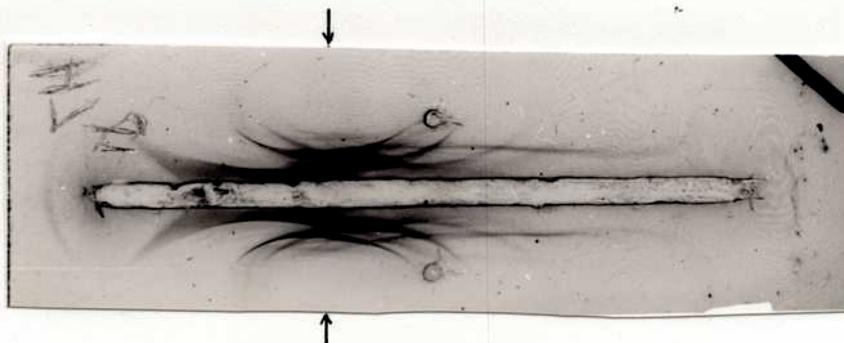


B: antígeno : 5 μ l de suero de *C. musculus* de 19 dpi que corresponden a 21 días de vida (línea negra) (fase aguda).

En el otro orificio se sembraron 5 μ l de suero de *C. musculus* de 13 días post inoculación de CRBN (15 días de vida).

antisuero : 80 μ l de antisuero parcial de *C. musculus*, obtenido en conejo.

INMUNOELECTROFORETOGRAMA C
FOTOGRAFIA N^o 8



C: antígeno : 5 μ l de suero de *C. musculus* de 71 dpi que corresponden a 73 días de vida (línea negra) (fase crónica).

En el otro orificio se sembraron 5 μ l de suero de *C. musculus* normal de 78 días de vida (suero control II). antisuero : 80 μ l de antisuero parcial de *C. musculus*, obtenido en conejo.

Los resultados obtenidos al utilizar los antisueros total y parcial de *C.musculus* para formar los precipitados en las inmunolectroforesis se aprecian en las fotografías N^o 6 (A) y N^o 7 y 8 (B-C) respectivamente.

Si comparamos el caso A con C (sueros de animales crónicos), comprobamos que en este último aparece menor cantidad de bandas inmunoprecipitadas con respecto al primero. La causa de lo descrito se debe a la preparación del antisuero parcial, que se realizó con parte de las proteínas del suero del *C.musculus* sano. En el caso C, se observa que la banda de la albúmina se tiñe en forma más tenue que en A y de este modo se permite la visualización nítida de las bandas vecinas a la albúmina.

Una vez que comparamos el poder resolutivo de ambos antisueros, analizamos todos los sueros que formaban la seroteca, mediante la técnica de inmunolectroforesis. No se observaron diferencias cuando se realizaron las comparaciones de las bandas de los inmunoprecipitados, obtenidos con las muestras provenientes de las fases aguda y crónica de la enfermedad con los controles I y II.

Hemos observado una variación fisiológica, en el análisis de nuestros inmunolectroforetogramas, que es posible observar si comparamos B con C. Claramente se observa que a medida que aumenta la edad de los animales (en C se sembraron sueros provenientes de animales de mayor edad que en B), se produce un incremento en el grosor de dos (2) bandas ubicadas en las cercanías de la albúmina. Lo mencionado se verifica tanto para sueros de animales controles, como para sueros de animales infectados. Es un proceso biológico propio del cricétido que se manifiesta con la edad del animal.

5 - DISCUSSION

El aislamiento de virus Junin a partir de *C.musculus* capturados en el campo (Sabattini et al., 1977), no sólo demostró la importancia de este cricétido como reservorio del virus, sino que llevó a considerar que la presencia viral no era deletérea para el huésped.

Este concepto se ha ido modificando ya que la infección de *C.musculus* neonatos con la cepa atenuada XJCl₃ enferma y mata al 50 - 70 % de los animales (Lampuri et al., 1982), por causas inmunológicas (Coulombié et al., 1986a) similares a las que ocurren en el ratón blanco recién nacido infectado con cualquier cepa de VJ (Nota et al., 1977). Más aún, *C.musculus* infectados con cepas de campo de VJ presentan una mortalidad tardía aumentada respecto de los controles no infectados, retardo en el crecimiento, al tiempo que decae su fertilidad (Vitullo et al., 1987).

En general, tanto en el hombre, como en el cobayo y en el primate *Callithrix jacchus* inoculados con cepas virulentas, se han encontrado alteraciones hematológicas tales como leucopenia, descenso de linfocitos y granulocitos neutrófilos y marcada plaquetopenia (Ruggiero et al., 1964; Schwarz et al., 1970; Guerrero et al., 1977; Weissenbacher et al., 1980a). Estas alteraciones van acompañadas en general por profusas hemorragias.

La cepa atenuada XJCl₃, derivada de la XJ, se caracteriza en cambio por no producir cambios hematológicos mensurables ni en el cobayo (Nota et al., 1969), ni el *Callithrix jacchus* (Weissenbacher y Damonte, 1983) ni en humanos voluntarios (Ruggiero et al., 1969; Parodi et al., 1970). Solo se ha reportado que la inoculación de cobayos de exocría con altas dosis de virus produce un descenso fugaz de plaquetas del que se recuperan rápidamente (Nota et al., 1969).

Los resultados que se presentan en este trabajo, muestran que la Cepa XJCl₃ produce en el *C.musculus*, durante el período agudo de la infección una disminución significativa de los linfocitos en aproximadamente el 40% de los animales inoculados, registrada entre los días 8 y 23 p i (Fig. N° 6).

Alché et al (1985) demostraron, utilizando este modelo que

entre los días 11 y 19 p i se encuentran cricétidos virémicos. El porcentaje mayor de animales con viremia, se encuentra en el día 13 p i. A partir de los cultivos de linfomonocitos obtenidos al día 14 p i, estos autores demuestran la producción de virus "in vitro".

Si relacionamos la presencia de viremia y linfopenia con la obtención de virus "in vitro", a partir de cultivos de linfomonocitos obtenidos de *C.musculus* que estaban en la etapa aguda de la enfermedad, podríamos suponer que la células mononucleares sanguíneas serían reservorios del virus y también posibles sitios de multiplicación del mismo. Lo expuesto podría explicar el descenso del número de linfocitos encontrado en los *C.musculus* infectados, si consideramos que el virus ejerza una acción citolítica directa o como en otras interacciones de virus-linfocitos, ocurra inhibición de la activación linfocitaria y de su proliferación y/o alteraciones en la recirculación de linfocitos entre la sangre y la linfa (Woodruff y Woodruff, 1975).

Otro ejemplo de asociación entre el VJ y la población linfomonocitaria se ha demostrado en pacientes con FHA que cursan el período agudo de la enfermedad (Ambrosio et al., 1982). en estos casos se ha descrito la aparición de viremia y disminución en la cantidad absoluta de los linfocitos que componen algunas de las subpoblaciones que se encuentra en sangre periférica (Vallejos et al., 1989). Estas alteraciones desaparecen durante la convalecencia precoz (Vallejos et al., 1985).

En cambio es difícil explicar porqué la linfopenia no ocurre en el 100% de los animales infectados. No estamos en condiciones de describir la evolución de los animales infectados que presentan o no linfopenia porque se registran muertes producidas por la extracción de sangre, al realizar los estudios hematológicos en animales de poca edad. Pero podemos precisar que la linfopenia se registró en animales con signos de enfermedad y en aquellos que aparentemente estaban sanos.

En la etapa crónica de la enfermedad no hemos observado modificaciones en la hematología de los cricétidos inoculados. Se determinaron los valores hematológicos desde el día 40 hasta el día 575 pi. Estos valores se hallan agrupados y analizados estadísticamente en los cuadros 9 y 10, junto con sus controles.

De los datos que conforman los cuadros 9 y 10, hemos extraído aquellos que corresponden a las determinaciones hematológicas halladas en los cricétidos infectados crónicamente en los cuales se realizó la búsqueda y el aislamiento de virus en cerebro. Estos valores están incluidos en el cuadro Nº 11.

Observando los mismo, queda claramente ejemplificado que los cricétidos persistentemente infectados, presenta valores hematológicos semejantes a los valores medios controles de cada determinación, incluidos en los cuadros 9 y 10.

Hemos comprobado que en la etapa crónica de la enfermedad no se observaron variaciones en la fórmula leucocitaria, por otra parte no se aisló virus de los cultivos de células mononucleares sanguíneas provenientes de *C.musculus* infectados en forma crónica (Alché et al., 1985) y en esta etapa de la enfermedad no se detectó inmunofluorescencia positiva en el tejido linfático (Lampuri, 1984). Estos resultados nos llevan a pensar que el virus Junin no interactuaría con los linfocitos en la fase crónica de la infección.

La persistencia de la infección con virus Junin, verificada en *C.musculus*, estaría relacionada con la aparición de variantes serológicas (Lampuri, 1984; Alché, 1989) cuya presencia ya ha sido detectada durante la etapa aguda. A pesar que el sitio preferencial de acantonamiento de los arenavirus es el cerebro con los conocimientos actuales no estamos en condiciones de señalar el posible ciclo de las variantes serológicas del VJ, las cuales aparecen en forma esporádica en la sangre de los cricétidos crónicos (Alché y Coto, 1986). Tampoco podemos asegurar si estas variantes antigénicas del VJ son las responsables del probable comportamiento diferencial con los linfocitos durante las fases aguda y crónica de la enfermedad o si intervendrían otros factores tales como modificaciones producidas en el estado inmunológico del *C.musculus* infectado.

Los estudios realizados con el LCMV y su portador muestran resultados diferentes a los que hemos hallado con el virus Junin. El LCMV multiplica en células mononucleares y linfocitos de ratón, durante las fases aguda y crónica de la enfermedad, pero el virus no es lítico y no produce efecto citopático en las células que infecta (Doyle y Oldstone, 1978; Popescu et al., 1979).

En la obtención de los valores de referencia hematológicos de la rata y el ratón se han descrito distintas variables que introducen modificaciones de origen biológico en los datos hallados, como ser: medio ambiente, cepa, edad, método de sujeción del roedor (físico o mediante anestesia), sitio de extracción de la muestra sanguínea (cola, punción cardíaca, seno retroorbital, vena yugular). Por otra parte el laboratorio también introduce variables cuando se realizan las determinaciones (Payne et al., 1976).

Teniendo en cuenta los conocimientos anteriormente citados y para poder comparar los datos hematológicos obtenidos del *C.musculus*, con sus controles correspondientes, tuvimos que analizar gran número de animales sanos, cuyas edades oscilaron entre 9 y 575 días. Hodara et al., (1987) determinaron los parámetros hematológicos de *C.musculus* normales en el período 21 - 120 días de edad. No encontraron diferencias entre los grupos etarios a excepción hecha del recuento leucocitario. Hemos presentado los datos hematológicos de *C.musculus* sanos, agrupados en los períodos 9-30, 40-160, 170-575 días de edad (CUADRO N° 7), donde se muestra la variación de los valores hallados con la edad del cricétido. Debido a que los grupos etarios analizados son diferentes, no podemos realizar una comparación precisa entre nuestros valores de referencia y los hallados por los autores citados.

Se ha encontrado que determinadas infecciones virales pueden inducir modificaciones en la homeostasis del hospedador. Estos virus no producen efecto citopático en las células que infectan, pero alteran la función celular diferenciada o "función lujosa" de las mismas (Oldstone, 1984).

Un ejemplo de lo citado anteriormente, lo encontramos en los resultados hallados en roedores infectados persistentemente con el LCMV. Estos animales presentan desórdenes en el crecimiento y en el metabolismo de la glucosa, asociados a una diferencia en la secreción de la hormona del crecimiento (GH) (Oldstone et al., 1985).

Hemos detectado la presencia de hipoglucemia, en *C.musculus* infectados con VJ, Cepa XJCl₃, la cual ha sido registrada entre los días 13 y 31 pi (CUADRO N° 12). Los niveles de glucosa en sangre se hallaron normalizados a los 43 dpi (CUADRO N° 13).

Oldstone et al., (1985), realizaron estudios, utilizando ratones C₃H, infectados a las 18 hs de vida por vía intracerebral, con 60-100 UFP de virus LCMV, cepas Arm, E₃₅₀, Pasteur, Traub y W.E.

Los autores encuentran que algunas cepas de virus LCM(Arm, E₃₅₀, Pasteur) replican con alto título en gran parte de las células que producen la GH, situadas en el lóbulo anterior de la glándula pituitaria. Esta infección afecta el normal funcionamiento de la "función lujosa" de las células somatotróficas, en consecuencia se produce un decrecimiento en la síntesis de la GH, que se manifiesta en los roedores inoculados esencialmente por presentar disminución en el crecimiento y alteración en el metabolismo de la glucosa (hipoglucemia).

Las modificaciones descritas se manifiestan moderadamente, cuando los ratones C₃H son infectados con la cepa Pasteur (Oldstone et al., 1985).

Las cepas Traub y W.E. infectan pocas células productoras de la GH y no inducen las alteraciones mencionadas en el hospedador.

En el modelo descrito por los autores intervienen factores genéticos del hospedador, pues solamente determinadas cepas ratones (C₃H) alteran la síntesis de GH y el metabolismo de la glucosa, por efecto de la infección viral.

Cuando los autores realizan experimentos de reconstitución del nivel de la GH en los ratones infectados, se restaura la homeostasis de los animales inoculados y éstos crecen y nivelan la glucosa sanguínea en forma equivalente a los controles correspondientes (Oldstone et al., 1985).

En nuestro modelo *C.musculus*, inoculado a los 2-4 días de edad, por vía ip, con 4000 DL₅₀ de VJ, Cepa XJCl₃, también se han descrito modificaciones en el tamaño y peso corporal (Lampuri et al., 1982).

Si unimos este hecho a nuestro hallazgo de niveles sanguíneos de glucosa disminuidos, se podría pensar que se estuviera estableciendo una interacción virus-célula semejante a la hallada por Oldstone et al., (1985), con la cepa Pasteur del

LCMV.

Otra causa que puede inducir un estado de hipoglucemia en el *C.musculinus* infectado, es el estado de salud del animal, en la fase aguda de la enfermedad. Si por la razón mencionada se induce una disminución de la apetencia alimentaria, esto se reflejaría en los niveles hallados de la glucosa sanguínea.

Con los estudios que se han realizado, no está comprobada la existencia y constitución de los complejos inmunes circulantes, en el *C.musculinus* infectado con VJ (Coulombié, 1986; Alché, 1989).

Las evidencias acumuladas hasta el momento, permiten descartar una posible patología, debida a complejos inmunes en la infección del *C.musculinus*, debido a la comprobación de ausencia de daño renal, característico de enfermedades asociadas a complejos virus-anticuerpos (Coulombié, 1986).

Hemos comprobado que no existe alteración en los niveles de urea sanguínea en animales infectados con VJ, en el estado agudo y crónico de la enfermedad. Estos resultados apoyan las comprobaciones anteriores, ya que inducen a descartar la presencia de glomerulonefritis provocada por los inmunocomplejos.

Hemos aplicado distintas técnicas de fraccionamiento proteico a muestras de suero provenientes de *C.musculinus* infectados con virus Junin, Cepa XJCl₃.

Separamos electroforéticamente las proteínas séricas de los cricétidos en acetato de celulosa, gel de poliacrilamida y hemos combinado ambas técnicas, dando origen a un procedimiento realizado en dos pasos sucesivos a) acetato de celulosa y b) gel de poliacrilamida.

En los fraccionamientos de sueros provenientes de animales que cursaban la etapa aguda de la enfermedad, realizados en placas de gel de poliacrilamida (fotografía N^o 1), observamos la intensificación de una banda proteica que llamamos x, así como la disminución en la intensidad de coloración de otra banda proteica que denominamos y. Estas variaciones descritas no se reflejan en el dosaje de proteínas totales, ya que no se

registraron variaciones significativas con los controles correspondientes (CUADRO N^o 15).

En la fase crónica de la enfermedad, los animales tienden a normalizar estas modificaciones (fotografía N^o 2).

Hemos pensado que los cambios descritos pueden deberse a una respuesta de fase aguda. Se han descrito varias causas que inducen este tipo de respuesta en el ser humano: invasión microbiológica, injuria del tejido, reacciones inmunológicas y procesos inflamatorios (Dinarelo, 1984).

La respuesta de fase aguda está caracterizada por cambios en las funciones metabólicas, endocrinológicas, inmunológicas y neurológicas. La mayoría de estos cambios se observan en horas o días después de la infección o inflamación (Dinarelo, 1984).

De todos los cambios mencionados, nos interesa particularmente la aparición de proteínas de fase aguda, que están definidas como aquellas que aumentan su concentración plasmática un 25% o un porcentaje mayor (Kushner, 1988).

Algunos autores llaman proteínas de fase aguda negativas a las que disminuyen su concentración en plasma (Kushner, 1988).

Es interesante señalar que las especies animales presentan distintas proteínas de fase aguda. Esto se verifica en especies muy relacionadas como son la rata y el ratón.

Se ha comprobado en todas las especies de mamíferos estudiados, la existencia de una síntesis aumentada en el fibrinógeno, α_1 glicoproteína ácida y haptoglobina, así como un decrecimiento en la concentración de la albúmina, durante la respuesta de fase aguda.

Las concentraciones de la proteína C reactiva (CPR), proteína sérica amiloide A (SAA) y proteína sérica amiloide P (SAP), presentan variaciones diferenciales en especies de mamíferos, durante la respuesta de fase aguda.

En el ratón: la proteína de mayor incremento es SAA, pero SAP también es reactante de fase aguda.

En la rata: α_2 macroglobulina es el marcador proteico de fase aguda (Kushner, 1988).

A pesar que no hemos realizado el aislamiento e identificación de las proteínas del *C.musculus* infectado que hemos denominado x e y , creemos que los cambios en las bandas proteicas nombradas se deben al establecimiento de una respuesta de fase aguda.

El evento fundamental en la iniciación de la respuesta de fase aguda es la producción de interleukina-1 (IL_1), un polipéptido que induce cambios clínicos y modificaciones detectadas por el laboratorio (Dinarello, 1984).

Entre los numerosos efectos biológicos de la IL_1 , en el hospedador, se ha señalado que la acción de la misma en la médula ósea induce un incremento en el número de neutrófilos (Dinarello, 1984).

Como hemos comprobado la existencia de neutrofilia en el *C.musculus* infectado con VJ (CUADRO N $^{\circ}$ 8), este es otro resultado que apoya nuestras suposiciones.

Utilizamos el suero humano normal como sistema de referencia en los distintos fraccionamientos realizados de las proteínas séricas de *C.musculus* sanos. Así al comparar ambos densitogramas obtenidos de la separación electroforética en acetato de celulosa, se encuentran marcadas diferencias que hemos señalado en los resultados (figura N $^{\circ}$ 7). Es particularmente notoria la configuración de la Fr_5 del suero del cricétido, que se observa como una banda netamente definida y no muy ancha, con respecto a su supuestamente análoga, la fracción γ globulina humana, que se caracteriza por ser una banda ancha y difusa.

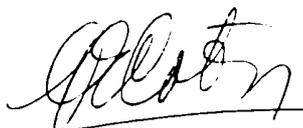
Esta diferencia señalada, fue determinada con mayor exactitud, cuando realizamos el fraccionamiento proteico en dos pasos sucesivos (acetato de celulosa y gel de poliacrilamida). En las fotografías N $^{\circ}$ 4 y 5, se observaron claramente separadas ambas bandas en el gel de poliacrilamida, muestran distinta resolución y supuestamente diferentes características biológicas.

Todo el análisis inmunolectroforético realizado, no nos permitió visualizar la existencia de variaciones observables

visualmente entre las bandas inmunoprecipitadas provenientes de animales inoculados con virus Junin, Cepa XJCl₃ y sus controles correspondientes. Solamente hemos detectado un aumento en el grosor de algunas bandas obtenidas en sueros de animales sanos, que atribuimos a variaciones fisiológicas al avanzar la edad del animal.

De todo el análisis bioquímico realizado en los cricétidos infectados con virus Junin, Cepa XJCl₃, concluimos que hemos detectado pocas alteraciones con las técnicas empleadas, confirmándose de esta manera que el *C. musculus* es un buen reservorio del virus Junin.

Esperamos que los resultados hallados aporten datos para un conocimiento más profundo, en el modelo estudiado, sobre la interacción virus-hospedador y en última instancia contribuyan al control de la FHA.


CELOTO


N. L. STEYERTNAL

BIBLIOGRAFIA

Alché, LE; Coulombié, FC; Coto, CE (1985). Aislamiento de virus Junin a partir de sangre y linfo-monocitos periféricos de *Calomys musculinus* infectados. Rev Argent Microbiol 17: 177-181.

Alché, LE; Coto, CE (1986). Antigenic variants of Junin virus isolated from infected *Calomys musculinus*. Arch Virol 90: 343-348.

Alché, LE; Coto, CE (1988). Differentiation of Junin virus and antigenic variants isolated in vivo by kinetic neutralization assays. J gen Virol 69: 2123-2127.

Alché, LE (1989). Infección experimental de *Calomys musculinus*, reservorio natural del virus Junin: aislamiento y caracterización de variantes antigénicas. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Allen, RC (1978). Applications of polyacrylamide gel electrophoresis and polyacrylamide gel isoelectric focusing in clinical chemistry. J Chromatogr 146: 1-32.

Ambrosio, AM; Enria, DA; Maiztegui, JI (1982). Aislamiento de virus Junin por co-cultivo de leucocitos periféricos de enfermos de Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). Medicina (Bs As) 42: 745.

Añon, MC; Grau, O; Martinez Segovia, Z; Franze Fernandez, MT (1976). RNA composition of Junin virus. J Virol 18: 833-838.

Arata, AA; Gratz, NG (1975). The structure of rodent faunas associated with arenaviral infections. Bull Who 52: 621-627.

Armstrong, CR; Lillie, RD (1934). Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. Public Health Rep (Washington) 49: 1019-1027.

Arribalzaga, RA (1955). Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enantemática. Día Médico 27: 1204-1210.

Auperin, DD; Romanowski, V; Galinski, M; Bishop, DML (1984). Sequencing studies of Pichindé arenavirus S-RNA indicate a novel

coding strategy, an ambisense viral S-RNA. J Virol 52: 897-904.

Auperin, DD; Sasso, DR; McCormick, JB (1986). Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of the Lassa virus S genome RNA. Virology 154: 155-167.

Barrera Oro, JG; Eddy, GA (1982). Characteristics of candidate life attenuated Junin virus vaccine. Presentado en: 4^o Internacional Conference on Comparative Virology. Banft, Alberta, Canadá, Octubre 17-22.

Barrera Oro, JG; Mac Donald, C; Kuehne, AI; Mahlandt, BC; Spisso, J; Meegan, JM; Peters, CJ; Lupton, HW (1986). Ensayos iniciales en humanos de una vacuna viva atenuada contra Fiebre Hemorrágica Argentina (Candid-1). Aislamiento de virus y respuesta serológica. Resumen en: II Congreso Argentino de Virología Córdoba 20 al 24 de octubre, pp 56.

Berría, MI; Gutman Frugone, LF; Girda, R; Barrera Oro, JG (1967). Estudios inmunológicos con virus Junin. Formación de anticuerpos en cobayos inoculados con virus vivo. Medicina (Bs As) 27: 93-98.

Berría, MI (1977). El virus Junin en cultivos celulares. Ciencia e Investigación 33: 355-358.

Bishop, DHL (1986). Arenaviruses have ambisense S-RNA. Med Microbiol Immunol 175: 61-62.

Bishop, DHL; Auperin, DD (1987). Arenavirus gene structure and organization. In "Arenaviruses. Genes, Proteins and Expression" Current Topics in Microbiology and Immunology (MBA Oldstone, Ed) vol 133, pp 5-17. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Bokisch, VA; Top, FH; Russell, PK; Dixon, FJ; Müller-Eberhard, HJ (1973). The potential pathogenic role of complement in Dengue hemorrhagic shock syndrome. N Engl J Med 289: 996-1000.

Boxaca, MC (1977). Fiebre Hemorrágica Experimental en el ratón. Aspectos virológicos. Ciencia e Investigación. 33: 332-339.

Bruns, M; Lehmann-Grube, F (1983). Lymphocytic choriomeningitis virus: V. Proposed structural arrangement of proteins in the

virion. J Gen Virol 64: 2157-2167.

Buchmeier, MJ; Oldstone, MBA (1978). Virus-induced immune complex disease: identification of specific viral antigens and antibodies deposited in complexes during chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection. J Immunol 120: 1297-1304.

Buchmeier, MJ; Parekh, BS (1987). Protein structure and expression among arenaviruses. In "Arenaviruses. Genes, Proteins and Expression" Current Topics in Microbiology and Immunology (MBA Oldstone, Ed) vol 133, pp 41-57. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Carter, MF; Biswal, N; Rawls, WE (1973). Characterization of nucleic acid of Pichindé virus. J Virol 11: 61-68.

Castagnino, JM (1968). Electroforesis en gel de poliacrilamida. En "Electroforesis". pp 228-247. Editorial Universitaria de Buenos Aires.

Clegg, JAC; Lloyd, G (1983). Structural and cell associated proteins of Lassa virus. J Gen Virol 64: 1127-1136.

Clegg, JCS; Oram, JD (1985). Molecular cloning of Lassa virus RNA: Nucleotide sequence and expression of the nucleocapsid protein gene. Virology 144: 363-372.

Cossio, P; Laguens, R; Arana, R; Segal, A; Maiztegui J (1975). Ultrastructural and immunohistochemical study of the human kidney in Argentine haemorrhagic fever. Virchows Arch [A] 368: 1-9.

Coulombié, FC; Coto, CE (1985). Efecto de la ciclofosfamida en el desarrollo de la infección de *Calomys musculinus*, con virus Junin. Medicina (Bs As) 45: 487-488.

Coulombié, FC; Laguens, RM; Coto, CE (1986a). Administration of antithymocyte serum modifies the response of *Calomys musculinus* to Junin virus infection. Intervirology 25: 56-60.

Coulombié, FC; Alché, LE; Lampuri, JS; Coto, CE (1986b). Role of *Calomys musculinus* peritoneal macrophages in age-related resistance to Junin virus infection. J Med Virol 18: 289-298.

Cummins, D; Fisher-Hoch, SP; Walshe, KJ; Mackie, JJ; McCormick, JB; Bennett, D; Perez, G; Farrar, B; Machin, SJ (1989). A plasma inhibitor of platelet aggregation in patients with Lassa fever. *Br J Haematol* 72: 543-548.

Cummins, D; Molinas, FC; Lerer, G; Maiztegui, JI; Faint, R; Machin SJ (1990). A plasma inhibitor of platelet aggregation in patients with Argentine hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2: 470-475.

Dacie, JV; Lewis, SM (1970). *Hematología Práctica* (J and A. Churchill Ltd, Ed) Ediciones Toray, S.A. - Barcelona pp. 1-78.

D'Aiutolo, AC; Cutrera, RA; Coto, CE (1981). Estudios morfométricos y citogenéticos de una colonia de *Calomys musculus*. Reunión de la Soc Arg de Virología. La Plata.

Damonte, EB; Coto, CE (1974). Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con los virus Junin y Tacaribe. *Rev Asoc Arg Microbiol* 6: 15-22.

De Bracco, MME; Rimoldi, MT; Cossio, PM; Rabinovich, A; Maiztegui, JI; Carballal, G; Arana, RM (1978). Argentine hemorrhagic fever. Alterations of the complement system and anti-Junin-virus humoral response. *N Engl J Med* 299: 216-221.

De Villafañe, G; Kravetz, FO; Donadío, O; Percich, R; Knecher, L; Torres, MP; Fernandez, N (1977). Dinámica de las comunidades de roedores en agro-ecosistemas pampásicos. *Medicina (Bs As)* 37 Supl 3: 128-140.

De Villafañe, G (1981a). Reproducción y crecimiento de *Akodon azarae* (Fischer, 1829). *Hist Nat* 1: 193-204.

De Villafañe, G (1981b). Reproducción y crecimiento de *Calomys musculus*. (Thomas, 1916). *Hist Nat.* 1: 237-256.

Dinarello, Ch. A (1984). Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med* 311: 1413-1418.

Downs, WG; Anderson, CR; Spence, L; Aitken, THG; Greenhall, A (1963). Tacaribe virus: a new agent isolated from *Artibeus* bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg* 12:

640-646.

Doyle, MV; Oldstone, MBA (1978). Interactions between viruses and lymphocytes. I "In vivo" replication of lymphocytic choriomeningitis virus in mononuclear cells during both chronic and acute viral infections. J Immunol 121: 1262-1269.

Drabkin, DL; Austin, JH (1932). "Spectrophotometric studies: spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood". J Biol Chem 98: 719-732.

Elsner, B; Schwarz, E; Mando, OG; Maiztegui, J; Vilches, A (1973). Pathology of 12 fatal cases of Argentine hemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg 22: 229-236.

Fenner, F (1976). Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology 7: 1-8.

Finch, CE; Foster, JR (1973). Hematologic and serum electrolyte values of the C₅₇ BL/6J Male mouse in maturity and senescence. Lab Anim Sci 23: 339-349.

Fine, PEM (1975). Vectors and vertical transmission: An epidemiologic perspective. Ann NY Acad Sci 266: 173-194.

Franze-Fernandez, MT; Zetina, C; Iapalucci, S; Lucero, MA; Bouissou, C; Lopez, R; Rey, O; Daheli, M; Cohen, GN; Zakin, MM (1987). Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe arenavirus S-RNA. Viruses Res 390-324.

Frith, Ch. H, Suber, RL; Umholtz, R (1980). Hematologic and clinical chemistry findings in control Balb/c and C₅₇ BL/6 mice. Lab Anim Sci 30: 835-840.

Gallardo, F (1970). Fiebre Hemorrágica Argentina. Hallazgos anatómo patológicos en diez necropsias. Medicina (Bs As) 30 Supl 1: 77-84.

Gard, GP; Vezza, AC; Bishop, DHL; Compans, RW (1977). Structural proteins of Tacaribe and Tamiami virions. Virology 83: 84-95.

Ghiringhelli, PD; Rivera-Pomar, RV; Lozano, ME; Grau, O;

Romanowski, V (1991). Molecular organization of Junin virus S-RNA: Complete nucleotide sequence, relationship with other members of the Arenaviridae and unusual secondary structures. J Gen Virol 72: 2129-2141.

González, PM; Cossio, PM; Arana, R; Maiztegui, JI; Laguens, RP (1980). Lymphatic tissue in Argentine hemorrhagic fever. Arch Pathol Lab Med 104: 250-254.

Grabar, P; Williams, C (1953). Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. Biochim Biophys Acta 10: 193-194.

Guerrero, LB; Boxaca, M; Weissenbacher, MC; Frigerio, MJ (1977). Infección experimental del cobayo con virus Junin Cuadro clínico, diseminación y eliminación del virus. Medicina (Bs As) 37: 271-278.

Guerrero, LB; Boxaca (1980). Estudio preliminar de una variante atenuada del virus Junin derivada de la cepa prototipo XJ. Medicina (Bs As) 40: 267-274.

Henry, RJ (1969). Hidratos de carbono Y sus Metabolitos. En: "Química Clínica, Bases y Principios". Editorial Jims - Barcelona - España, pp. 757-852.

Hodara, VL (1987). Cricétidos involucrados en la transmisión del virus Junin: su biología en condiciones de laboratorio. Tesis doctoral Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales.

Hodara, V; Quintans, CJ; Montoro, LS; Merani, MS (1987). Hematology, serum chemistry and urinalysis values of vesper mice (*Calomys musculus*). Lab Anim Sci 27: 113-115.

Howard, CR (1986). Arenaviruses. In "Perspectives in Medical Virology". (AJ Zuckerman, Ed) Vol 2, pp. 1-22. Elsevier Amsterdam New York Oxford.

Iapalucci, S; Lopez, R; Rey, O; Lopez, N; Franze-Fernández, MT; Cohen, GN; Lucero, M; Ochoa, A; Zakin, MM (1989a). Tacaribe virus L gene encodes a protein of 2210 amino acid residues. Virology 170: 40-47.

Iapalucci, S; Lopez, N; Rey, O; Zakin, MM; Cohen, GN; France-Fernandez, MT; (1989b). The 5' region of Tacaribe virus L RNA encodes a protein with a potential metal binding domain. *Virology* 173: 357-361.

IFCC (Federación Internacional de Química Clínica) (1988). Panel de expertos en teoría de los valores de referencia. *Acta Bioq Clín Latinoam* 22: 453-472.

Kenyon, RH; Green, DE; Peters, CI (1985). Effect of immunosuppression on experimental Argentine hemorrhagic fever in guinea pigs. *J Virol* 53: 75-80.

Kenyon, RH; Barrera Oro, JG; Mac Donald, C; Meegan, J; Peters, CJ (1988). Lymphocyte transformation assays for Junin virus. Resumen en: Segunda Conferencia Internacional sobre el impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de países de Latinoamérica y de la Región del Caribe. Mar del Plata 20 al 25 de marzo. Abst PE4, pp. 170.

Kohn, J (1957). A Cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. *Clin Chim Acta* 2: 297-303.

Kravetz, FO (1977). Ecología y control de reservorios. *Ciencia e Investigación* 33: 235-242.

Kravetz, FO; Busch, M; Percich, R; Manjón, MC; Marconi, P (1981). Ecología de *Calomys laucha* (Rodentia, Cricetidae) en el departamento de Río Cuarto (Córdoba). II Criterios para la determinación de edades y crecimiento. *Ecología* 6: 35-44.

Kushner, I (1988). The acute phase response: an overview. *Methods in Enzymology* 163: 373-383.

Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.

Laguens, RM; Lampuri, JS; Candurra, N; Coto, CE; Laguens, RP (1982a). Producción de meningoencefalitis en el *Calomys musculinus* adulto por la infección por vía nasal con la cepa XJCl₃ de virus Junin. III Congreso Argentino de Microbiología Bs As 1 al 5 agosto. Resumen 6-176.

Laguens, RM; Lampuri, JS; Coto, CE; Laguens, RP (1982b). Patología de la infección persistente del *Calomys musculinus*, con una cepa atenuada del virus Junin. Medicina (Bs As) 42: 273-278.

Lampuri, JS; Vidal, M del C; Coto, CE (1982). Respuesta del *Calomys musculinus* a la infección experimental con virus Junin. Medicina (Bs As) 42: 61-66.

Lampuri, JS; Coto, CE (1983). Responsabilidad de las variantes serológicas en la infección crónica con virus Junin. Medicina (Bs As) 43: 733-734.

Lampuri, JS (1984). Infección experimental del *Calomys musculinus* con virus Junin: Modelo de infección crónica. Tesis doctoral. Facultad de Ciencia Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Lampuri, JS; Laguens, RM; Coto, CE; Laguens, RP (1985). Estudios sobre la transmisión del virus Junin en *Calomys musculinus* infectados experimentalmente con la cepa XJCl₃. IV Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires 5 al 9 agosto. Resumen Nº 851.

Laurell, CB (1973). Electrophoresis, specific protein assays, or both in measurement of plasma proteins?. Clin Chem 19: 99-102.

Leonard, R; Ruben, Z (1986). Hematology reference values for peripheral blood of laboratory rats. Lab Anim Sci 36: 277-280.

Lowry, OH; Rosenbrough, NJ; Farr, AL; Randall, RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.

Mac Donald, C; Mc Kee, K; Briggiler, A; Feinsod, F; Morrill, J; Gibbs, P; Peters, C; Maiztegui, J; Barrera Oro, JG (1986). Ensayos iniciales en humanos de una vacuna viva atenuada contra Fiebre Hemorrágica Argentina (Candid 1) Semiología y Laboratorio Clínico. Resumen en: II Congreso Argentino de Virología. Córdoba 20 al 24 octubre, pp. 55.

Maiztegui, JI; Laguens, RP; Cossio, PM; Casanova, MB; De la Vega, MT; Ritacco, V; Segal, A; Fernandez, NJ; Arana, RM (1975). Ultrastructural and immunohistochemical studies in five cases of

Argentine hemorrhagic fever. J Infect Dis 132: 35-43.

Maiztegui, JI; Sabattini, MS (1977). Extensión progresiva del área endémica de la Fiebre Hemorrágica Argentina. Medicina (Bs As) 37 Supl 3: 162-166.

Martinez Peralta, LA; Cossio, PM; Sabattini, M; Maiztegui, JI; Arana, RM; Laguens, RP (1979). Ultrastructural, immunohistochemical and virological studies in organs of *Calomys musculinus* infected with Junin virus by natural routes. Medicina (Bs As) 39: 213-217.

Martinez Segovia, Z; De Mitri, MI (1977). Junin virus structural proteins. J Virol 21: 579-583.

Merani, MS; Lizarralde, MS (1980). *Akodon molinae* (Rodentia, Cricetidae), a new laboratory animal: Breeding, management and reproductive performance. Lab Anim 14: 129-131.

Merani, MS; Vercellini, O; Acuña, AM; Horgan, C; Roldan, ERS (1983). Growth and reproduction of two species of *Akodon* and their hybrids. J Exp Zoo. 228: 527-535.

Mersich, SE; Castilla, V; Damonte, EB (1988). Lectin affinity of Junin virus glycoproteins. Ann Inst Pasteur Virol 139: 277-284.

Mettler, NE; Buckley, SN; Casals, J (1961). Propagation of Junin virus, the etiological agent of Argentine hemorrhagic fever, in Hela cell cultures. Proc Soc Exp Biol Med 107: 684-688.

Molinas, FC; De Bracco, MME; Maiztegui, JI (1989). Hemostasis and the Complement System in Argentine hemorrhagic fever. Reviews of infections diseases 11 supl 4: 762-770.

Murphy, FA; Webb, PA; Johnson, KM; Whitfield, SG; Chappell, WA (1970). Arenavirus in vero cells: ultrastructural studies. J Virol 6: 507-518.

Murphy, FA; Winfield, SG; Webb, PA; Johnson, KM (1973). Ultrastructural studies of arenaviruses. In "Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses ". (F Lehmann-Grube, Ed) pp. 273-285. Springer Verlag, New York.

Murphy, FA; Whitfield, SG (1975). Morphology and morphogenesis of arenaviruses. Bull Who 52: 409-420.

Nota, NR; Frigerio, MJ; Guerrero, LB; Nejamkis, MR (1969). Estudio hematológico en cobayos infectados con virus Junin, Cepa XJ y cepa XJClon₃. Medicina (Bs As) 29: 171-174.

Nota, NR; Nejamkis, MR; Giovanniello, OA (1977). Patogenia de la encefalitis del ratón infectado con virus Junin. Medicina (Bs As) 37: 114-120.

Oldstone, MBA (1984). Virus can alter cell function without causing cell pathology: disordered function leads to imbalance of homeostasis and disease. In: :Concepts in viral pathogenesis. (AL Notkins, MBA Oldstone, Ed) pp. 269-276. Springer-Verlag, New York.

Oldstone, MBA; Ahmed, R; Buchmeier, MJ; Blount, P; Tishon, A (1985). Perturbation of differentiated functions during viral infection "in vivo". I Relationship of lymphocytic choriomeningitis virus and host strains to growth hormone deficiency. Virology 142: 158-174.

Ouchterlony, O (1967). Antigen-antibody crossed electrophoresis. In: "Handbook of Experimental Immunology". (DM Weir Ed) Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburg, pp. 697-700.

Parodi, AS; Greenway, DJ; Ruggiero, HR; Rivero, E; Frigerio, MJ; Mettler, NE; Garzon, F; Boxaca, MC; Guerrero, LB; Nota, NR (1958). Sobre la etiología del brote epidémico de Junin. Día Médico 30: 2300-2302.

Parodi, AS; De la Barrera, JM; Rugiero, HR; Greenway, DJ; Yerga, H; Mettler, NE; Boxaca, M; Frigerio, MJ (1959). Los reservorios del virus de la fiebre hemorrágica epidémica de la Provincia de Buenos Aires. Prensa Med Arg 46: 554-556.

Parodi, AS; Guerrero, LB; Astarloa, L; Cintora, A; González Cambáceres, C; Maglio, F; Magnoni, C; Milani, M; Ruggiero, M; Squassi, G (1970). Inmunización contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con una cepa atenuada del virus Junin. IV Valoración de respuestas clínicas e inmunológicas. Medicina (Bs As) 30 Supl 1 : 3-7.

Payne, BJ; Lewis, HB; Murchinson, TE; Hart, EA (1976). Hematology of laboratory animals. In: "Handbook of laboratory animal sciences" (E Melby and N Altman, Ed) 3: 383-461. CRC Pres Inc, Cleveland, OH.

Pirosky, I; Zuccarini, J; Molinelli, EA; Di Pietro, A; Barrera Oro, JG; Martini, P; Copello, AR (1959). Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense; endemo-epidémica, febril, enantemática y leucopénica. Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública. Instituto Nacional de Microbiología, pp. 1-197.

Popescu, M; Lohler, J; Lehmann-Grube, F (1979). Infectious lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis virus carrier mice. J Gen Virol 42: 481-492.

Rawls, WE; Buchmeier, MJ (1975). Arenavirus: Purification and physicochemical nature. Bull Who 52: 383-402.

Reed, LJ; Muench, HA (1938). A simple method of estimating 50% end points. Ann J Hyg 27: 493-497.

Romanowski, V; Atsura, Y; Bishop, DML (1985). Complete sequence on the S-RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE Strain) compared to that of Pichinde arenavirus. Virus Res 3: 101-114.

Rowe, WP; Murphy, PA; Bergold, GH; Casals, J; Hotchin, J; Johnson, KM; Lehmann-Grube, F; Mims, CA; Traub, E; Webb, PA (1970a). Arenaviruses. Proposed name for a newly defined virus group. J Virol 5: 651-652.

Rowe, WP; Pugh, W; Webb, PA; Peters, CJ (1970b). Serological relationship of the Tacaribe complex of virus to LCM virus. J Virol 5: 289-292.

Rugiero, HR; Milani, M; Giacosa, A; Fernandez, D; Cintora, FA; Magnoni, C; Ruggiero, M; Astarloa, L; Maglio, F; González Cambáceres, C; Squassi, G (1964). Fiebre Hemorrágica Argentina. V Laboratorio clínico. Importancia diagnóstica y correlación clínica. Medicina (Bs As) 78: 611-618.

Rugiero, HR; Astarloa, L; González Cambáceres, C; Maglio, F; Squassi, G (1969). Inmunización contra la Fiebre Hemorrágica

Argentina con una cepa atenuada del virus Junin II. Inmunización de voluntarios. Análisis clínico y de laboratorio. Medicina (Bs As) 29: 81-87.

Sabattini, MS (1966). Virus Junin en la Provincia de Córdoba. Comisión Nacional Coordinadora para estudio y lucha contra la Fiebre Hemorrágica Argentina, Bs As, pp. 85-102.

Sabattini, MS; González del Río, L; Diaz, G; Vega, VR (1977). Infección natural y experimental del roedores con virus Junin. Medicina (Bs As) 37 Supl 3 : 149-161.

Salas, R; De Manzione, N; Tesh, RB; Rico-Hesse, R; Shope, RE; Betancourt, A; Godoy, O; Bruzual, R; Pacheco, ME; Ramos, B; Taibo, ME; Tamayo, JG; Jaimes, E; Vazquez C; Araoz, F; Querales, J; (1991)

Venezuelan haemorrhagic fever. The Lancet 338: 1033-1036.

Salvato, M; Schimomaye, EM (1989). The complete sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for zinc finger protein. Virology 173: 1-10.

Salvato, M; Schimomaye, EM; Oldstone, MBA (1989). The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase. Virology 169: 377-384.

Scheidegger, JJ (1955). Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. Int Arch Allergy 7: 103-110.

Schwarz, ER; Mando, DG; Maiztegui, JI; Vilches, AM (1970). Síntomas y signos iniciales de mayor valor diagnóstico en la Fiebre Hemorrágica Argentina. Medicina (Bs As) 30 Supl 1 : 8-14.

Schwarz, ER; Mando, DG; Maiztegui, JI; Vilches, AM; Otero, ER; Berrutti, ZC (1972). Alteraciones de la coagulación en la Fiebre Hemorrágica Argentina. Medicina (Bs As) 32: 247-259.

Sokal, RR; Rohlf, FJ (1969). Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. (R Emerson, D Kennedy, RB Park, Ed) WH Freeman and Company. San Francisco.

Stergermann, H; Loeschecke, V (1962). Mikrobestimmung von

Stickstoff als Indophenolblau nach Chloramin-T-Oxydation. Z Physiol Chem 329: 241-248.

Vallejos, DA; Ambrosio, AM; Gamboa, G; Briggiler, AM; Maiztegui, JI (1985). Alteraciones de las subpoblaciones linfocitarias en la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). Medicina (Bs As) 45: 407.

Vallejos, DA; Ambrosio, AM; Fevillade, MR; Maiztegui, JI (1989).+K
Lymphocyte subsets alteration in patients with Argentine hemorrhagic fever. J Med Virol 27: 160-163.

Veza, AC; Gard, GP; Compans, RW; Bishop, DHL (1977). Structural components of the arenavirus Pichinde. J Virol 23: 776-786.

Veza, AC; Clewley, JP; Gard, GP (1978). Virion RNA species of the arenaviruses Pichinde, Tacaribe and Tamiami. J Virol 26: 485-497.

Videla, C (1988). Aportes para el control de la Fiebre Hemorrágica Argentina. Tesis doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Vitullo, AD; Hodara, VL; Merani, MS (1987). Effect of persistent infection with Junin virus on growth and reproduction of its natural reservoir, *Calomys musculinus*. Ann J Trop Med Hyg 37: 663-669.

Vitullo, AD (1989). Análisis de la relación huésped-patógeno en el Sistema *Calomys*-virus Junin. Tesis doctoral: Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Walker, DH; Murphy, FA (1987). Pathology and pathogenesis of arenavirus infections. In: "Arenaviruses, Genes, Proteins and Expression". Current Topics in Microbiology and Immunology (MBA Oldstone, Ed) Vol 133, pp. 89-113. Springer-Verlag Berlin.

Weisse, VJ; Knappen, F; Frolke, W; Guenard, J; Kollner, M; Stotzer, H (1974). Blutwerte der Ratte in Abhängigkeit von alter und Geschlecht. Arzneim-Forsch (Drug Res) 24: 1221-1225.

Weissenbacher, MC; Guerrero, LB; Frigerio, MJ (1976a). Infección subclínica, infección clínica y vacunación con virus Junin. Medicina (Bs As) 36: 1-8.

Weissenbacher, MC; Coto, CE; Calello, MA (1976b). Cross protection between Tacaribe complex viruses. Presence of neutralizing antibodies against Junin virus (Argentine hemorrhagic fever) in guinea pigs infected with Tacaribe virus. *Intervirology* 6: 42-49.

Weissenbacher, MC; Grela, MC; Sabattini, MS; Maiztegui, JI; Coto, CE; Frigerio, MJ; Cossio, PM; Rabinovich, AS; Barrera Oro, JG (1978). Inapparent infections with Junin virus among laboratory workers. *J Infect Dis* 137: 309-313.

Weissenbacher, MC; Calello, MA; Rondinone, SN; Travi, B; Frigerio, MJ (1980a). Infección de Primates del Nuevo Mundo con virus Junin. II *Callithrix Jacchus*. *Medicina (Bs As)* 40: 21-30.

Weissenbacher, MC; Edelmut, E; Frigerio, MJ; Coto, CE; Guerrero, LB (1980b). Serological survey to detect subclinical Junin virus infection in laboratory personnel. *J Med Virol* 6: 223-226.

Weissenbacher, MC; Coto, CE; Calello, MA; Rondinone, SN; Damonte, EB; Frigerio, MJ; (1982). Cross-protection in nonhuman primates against Argentine hemorrhagic fever. *Infect Immun* 35: 425-430.

Weissenbacher, MC; Damonte, EB (1983). Fiebre Hemorrágica Argentina. *Adel Microbiol Enf Infecc* 2: 119-171.

Weissenbacher, MC; Calello, MA; Carvallal, G; Planes, N; De la Vega, MT; Kravetz, FO (1985). Actividad del virus Junin en humanos y roedores de áreas no endémicas de la Provincia de Buenos Aires. *Medicina (Bs As)* 45: 263-268.

Weissenbacher, MC; Laguens, RP; Coto, CE (1987). Argentine hemorrhagic fever. In: "Arenaviruses. Biology and Immunotherapy". *Current Topics in Microbiology and Immunology* (MBA Oldstone, Ed) Vol. 134, pp. 79-116. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Woodruff, JF; Woodruff JJ (1975). The effect of viral infections on the function on the immune system. In: "Viral Immunology and Immunopathology". (AL Notkins, Ed) pp. 393-418. Academic Press, New York.